

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DE DIFFÉRENTS MUTANTS DE
LA STOMATITE VÉSICULEUSE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
FRÉDÉRICK BRASSARD

NOVEMBRE 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement n°8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur, le Dr Laurent Poliquin pour sa rigueur et son désir de faire avancer cette belle science ainsi que mes anciens et nouveaux collègues Ian Boisseau, Jean-Michel Girard, Christian Moro, Rose-Marie Brito, Valérie Janelle, Alain Roy et Katia Dupont. Je remercie également la force nucléaire, électrofaible, électromagnétique, gravitationnelle et le temps pour avoir agencé la matière de manière à permettre l'apparition de petits systèmes visqueux luttant contre l'entropie. Je remercie les physiciens à qui nous devons une bonne partie des avancées de la biologie.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
ABRÉVIATIONS.....	viii
RÉSUMÉ.....	x
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES	4
1.1. Cancer et thérapies.....	4
1.1.1. Oncogenèse	4
1.1.2. La radiothérapie	6
1.1.3. La chimiothérapie	7
1.1.4. L'immunothérapie.....	8
1.2. Virus oncolytiques	9
1.2.1. Virus oncolytiques naturels	10
1.2.2. Virus oncolytiques recombinants.....	10
1.2.3. Les désavantages de la virothérapie oncolytique	14
1.2.4. Solutions aux risques potentiels	15
1.3 Virus de la stomatite vésiculeuse.....	16
1.3.1. Description.....	16
1.3.2. Protéines N et P	16
1.3.3. Protéine M	18
1.3.3.1. Description et fonctions.....	18
1.3.3.2. Localisation.....	19
1.3.3.3. Les signaux de M	19
1.3.3.4. Inhibition de la transcription et traduction.....	20

1.4 But	30
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	31
2.1. Cellules et culture cellulaire.....	31
2.2. Souches virales	31
2.3. Infection.....	32
2.4. Récolte	32
2.5. Extraction des ARN totaux	33
2.6. RT-PCR	33
2.7. Purification de l'ADN	36
2.8. Séquençage	36
2.9. Analyse des séquences nucléotidiques et des protéines	36
2.10. Analyse des structures secondaire et tertiaire des protéines.....	37
2.11 Analyse des changements post-traductionnels de TP5R1, TP5, TP6R1 et TP6.....	37
CHAPITRE III : RÉSULTATS.....	39
3.1. Séquence en acides aminés des protéines de HR et ses mutants	39
3.2. Prédiction des structures secondaires de HR et ses mutants.....	49
3.3 Prédiction des structures tertiaires de G de HR et ses mutants.....	53
CHAPITRE IV : DISCUSSION.....	57
CONCLUSION et PERSPECTIVES	66
RÉFÉRENCES	68

CHAPITRE III : RÉSULTATS	40
3.1. Séquence en acides aminés des protéines de HR et ses mutants	41
3.2. Prédiction des structures secondaires de HR et ses mutants.....	49
3.3 Prédiction des structures tertiaires de G de HR et ses mutants.....	53
3.4. Analyse de changements post-traductionnels suite à la mutation E254G de TP6 et TP6R1 et E254Q de TP5 et TP5R1 sur la protéine G	56
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	57
CONCLUSION et PERSPECTIVES	66
RÉFÉRENCES	68

LISTES DES FIGURES

Figure	Page
1	Représentation du virus de la stomatite vésiculeuse..... 14
2	Schéma des cinq produits de RT-PCR utilisés pour le séquençage..... 34
3	Migration sur gel d'agarose 1% de cinq produits de RT-PCR purifiés sur gel correspondant au génome de mutants thermosensibles du VSV 40
4	Séquence en acides aminés de la protéine N du VSV-Indiana wt HR et ses mutants thermosensibles et thermorésistants..... 42
5	Séquence en acides aminés de la protéine P du VSV-Indiana wt HR et ses mutants thermosensibles et thermorésistants..... 43
6	Séquence en acides aminés de la protéine M du VSV-Indiana wt HR et ses mutants thermosensibles et thermorésistants..... 45
7	Séquence en acides aminés de la protéine G du VSV-Indiana wt HR et ses mutants thermosensibles et thermorésistants..... 46
8	Séquence en acides aminés de la protéine L du VSV-Indiana wt HR et ses mutants thermosensibles et thermorésistants..... 48
9	Structures secondaires des protéines N, P, M, G, et L du VSV-Indiana wt HR et ses mutants thermosensibles et thermorésistants 52
10	Impact des mutations sur la structure de protéines G dans la « prefusion form » appartenant à la souche parentale HR du VSV et ses mutants 55

LISTES DES TABLEAUX

Tableau	Page
I Virus oncolytiques et leur mécanisme d'action.....	14
II Séquence des amorces utilisées pour la transcription inverse et l'amplification par PCR du génome du VSV HR et ses mutants	35
III Séquence des amorces utilisées pour le séquençage des segments NPMG, GL, L1, L3, L2 qui composent le génome du VSV HR et ses mutants.....	35

LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$	Intégrines
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNPII	ARN polymérase II
BHK	Baby hamster kidney
BP1	<i>Binding protein 1</i>
CAR	<i>Cocksakie adenoviral receptor</i>
c-JUN	protéine du facteur de transcription activating protein 1
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de type I
C-terminal	Extrémité carboxy terminale d'une protéine
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i>
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DMEM	<i>Dubelco modified eagle's medium</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
eIF-2	<i>Eucaryotic initiation factor 2</i>
eIF-4A	<i>Eucaryotic initiation factor 4E</i>
eIF-4F	<i>Eucaryotic initiation factor 4F</i>
eIF-4G	<i>Eucaryotic initiation factor 4G</i>
ESCRT-I	<i>Vacuolar protein sorting machinery</i>
GDP	Guanosine diphosphate
GJIC	<i>Gap Junctional Intercellular Communication</i>
GMP	Guanosine monophosphate
GTP	Guanosine triphosphate
Her2/neu	Antigène de surface de cancer du sein
HR	<i>Heat resistant</i>
HSV-I	<i>Herpès simplex virus</i>
HSV-TK	<i>Herpès simplex virus tyrosine kinase</i>
HTERT	Transcriptase inverse de la télomérase humaine
IKK	<i>I-kappa-B-kinase</i>
IL-4	Interleukine-4
IL-12	Interleukine-12
IMRT	<i>Intensity modulated radiotherapy</i>
INF- α/β	Interféron de type I α et β
IRF-3	<i>Interferon response factor 3</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
LENT	<i>Late effects on normal tissues</i>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
MLV	<i>Murine leukemia virus</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MNK-1	<i>Copper transporting P-type ATPase</i>

MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MoMSV	<i>Moloney murine sarcoma virus</i>
Mos	Kinase oncogénique bloquant la méiose en métaphase II
M-PMV	<i>Mason-Pfizer monkey virus</i>
MxA	GTPase induite par les interférons
NFKb	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NLS	<i>Nucleus localization signal</i>
NUP98	Nucléopore 98
NY-ESO-1	Antigène associé aux mélanomes et épithéliomes
OAS	<i>Oligo adenylate synthase</i>
P53	Gène suppresseur de tumeur et activateur de l'apoptose
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PHAS1	<i>Phosphorylated, Heat and Acid Stable regulated by Insulin</i>
PH domain	<i>Pleckstrin homology domain</i>
PKR	Protéine kinase R
PSA	<i>Prostate-specific antigen</i>
Rae1	Récepteur d'exportation de la nucléopore 98
Ras	Protéine G oncogénique
Rb	Gène suppresseur de tumeur du rétinoblastome
RISM	<i>Radiation-induced second malignancies</i>
RNases	Enzyme coupant l'ARN
RNP	Ribonucléoprotéine
Ro / Ssa	Complexe de petites particules ribonucléoprotéiques
RSV :	<i>Respiratory syncytial virus</i>
RV	<i>Rabies virus</i>
SFV	<i>Semliki forest virus</i>
SLAM	<i>Signaling lymphocytic activation molecule</i>
SLE	<i>Systemic Lupus Erythematosus</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
Src	Protéine kinase protooncogène
TAA	<i>Tumor associated antigen</i>
TAF	<i>TBP associated factor</i>
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
Tet-off	Interrupteur moléculaire
TFIID	Facteur de transcription D de la polymérase II
TK	Thymidine kinase
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
μL	Microlitre
μg	microgramme
V	Volt
VPS4	<i>Vacuolar protein sorting pathway</i>
VSV	Virus de la stomatite vésiculeuse

RÉSUMÉ

Malgré les avancées considérables de la cancérologie, de nouvelles thérapies sont toujours recherchées étant donné les effets secondaires des traitements actuels. Peu connue, la virothérapie oncolytique consiste à utiliser un virus pour détruire des cellules cancéreuses tout en épargnant les saines. Sur les mutants T1026R1 et TP3R1 du VSV de la famille des vésiculovirus portant un génome à ARN négatif de 11kb, des efforts sont entrepris afin de prouver qu'ils sont des armes efficaces contre le cancer. Cependant, leur faible pouvoir apoptotique ainsi que la persistance démontrée pour T1026R1 dans les cellules H4 les rendent moins attrayants. D'autres mutants du VSV, soit TR5R1 et TP6R1 pourraient également être de bons candidats dans la virothérapie oncolytique. Ils ne persistent pas, ils sont de meilleurs inducteurs d'apoptose et comme les mutants T1026R1 et TP3R1, ils induisent fortement la réponse des interférons. Afin de comprendre les différences quant au phénotype d'infection des mutants TP5R1 et TP6R1, le séquençage du génome entier de la souche sauvage HR ainsi que tous les mutants thermosensibles et thermorésistants a été entrepris. Les mutations responsables de la thermosensibilité vs thermorésistance pourront du même coup être révélées. Les résultats confirment les mutations M51R sur la protéine de la matrice de T1026R1 et de T1026 et V221F-S226R de TP3R1. Les mutants TP5R1 et TP6R1 portent respectivement les mutations E254Q et E254G sur le « PH domain » de leur glycoprotéine. Les mêmes mutations sont retrouvées chez TP5 et TP6 avec en plus la mutation D232G aussi sur le « PH domain ». L'analyse de la structure secondaire montre des changements par rapport au VSV Indiana HR, alors que l'analyse de la structure tridimensionnelle montre que seule la mutation D232G altère la structure. La présence de cette mutation sur les souches thermosensibles T1026, TP5, TP6 et le VSV Indiana San Juan ainsi que sa conséquence sur la structure 3D laissent présager qu'elle pourrait être responsable de la thermosensibilité. La cartographie génétique des virus HR, T1026, T1026R1, TP3, TP3R1, TP5, TP5R1, TP6 et TP6R1 permettra d'approfondir la compréhension de leur phénotype d'infection particulier pour éventuellement construire un virus oncolytique recombinant conjuguant les avantages de chacun.

INTRODUCTION

Selon les statistiques canadiennes sur le cancer, publiées par la Société canadienne du cancer en 2004, cette maladie est la première cause de décès prématuré au Canada. D'après D^{re} Barbara Whyllie, chef de la direction de la Société canadienne du cancer, les tendances actuelles donnent à penser que, d'ici 2010, le cancer passera au premier rang des causes de mortalité au Canada. On estime à 149 000 le nombre de nouveaux cas de cancers et à 69 500 le nombre de décès attribuables au cancer en 2005-2006 (Société canadienne du cancer, 2005-2006). Aux États-Unis, le cancer tue 1500 personnes chaque jour et le nombre de nouveaux cancers chaque année est estimé à 1 300 000. Les dépenses liées aux soins de santé et coûts sociaux dans ce pays s'élèvent à 189,5 milliards de dollars (American Cancer Society, 2006). L'importance de la maladie entraîne la mise en place de travaux de recherche ayant pour but de limiter le nombre de nouveau cas.

Actuellement, les traitements proposés contre le cancer sont la chimiothérapie, la radiothérapie, la chirurgie et plus récemment les immunothérapies et virothérapies. Du nombre total de cancer déclarés chaque année aux États-Unis, il a été estimé qu'un cancer sur six était la conséquence d'un traitement contre un premier cancer (Allan et Travis, 2005). Devant ces faits, des efforts pour trouver des méthodes amoindrissant les risques de développer un autre cancer doivent être entrepris. Afin d'augmenter les chances de succès des méthodes actuelles, des anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules cancéreuses et des inhibiteurs de l'angiogénèse sont utilisés lorsque c'est possible

.

Parmi les méthodes prometteuses se trouve la virothérapie oncolytique qui consiste à détruire les cellules cancéreuses grâce à des virus. Avant que l'homme y ait songé, cette thérapie était déjà présente dans la nature. En effet, autrefois, les cliniciens ont observé qu'une infection virale naturelle pouvait mener à une

suppression de tumeur, jusqu'à la faire disparaître entièrement. Depuis ce temps, quelques virus se répliquant plus favorablement dans les cellules cancéreuses ont été identifiés.

La virothérapie oncolytique n'est pas encore très populaire car un bon nombre de craintes existent. Les compagnies pharmaceutiques américaines s'intéressent lentement au projet ce qui limite les investissements. De plus, le décès de M. Jesse Gelsinger en septembre 1999 suite à une thérapie génique utilisant un adénovirus pour traiter une maladie génétique (une déficience en ornithine transcarbamylase) n'a pas augmenté l'enthousiasme des investisseurs pour l'utilisation clinique de virus. Une cascade de cytokines induites suite à l'injection du virus a provoqué une coagulation intravasculaire menant à une dysfonction de plusieurs organes ainsi qu'une détresse respiratoire (Raper *et al.*, 2002). L'arrivée d'autres techniques moins controversées comme des drogues ciblant des protéines kinases et des anticorps s'attachant à des protéines de surface des cellules cancéreuses ont également attiré le regard des investisseurs plus que l'utilisation de virus. Contrairement à l'Amérique, la Chine devrait approuver sous peu l'utilisation d'adénovirus comme thérapie anti-cancer (McCormick, 2003).

Parmi les virus oncolytiques prometteurs se trouve le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV). C'est sa sensibilité aux interférons qui lui donne cette caractéristique. Étant donné que beaucoup de cellules cancéreuses ont un mécanisme interféron dysfonctionnel, l'infection par le VSV est facilitée. Dans notre laboratoire, nous avons des mutants spontanés provenant de la souche parentale Indiana HR. Ces mutants ont été isolés car ils induisent fortement les interférons et tuent les cellules plus lentement ou plus rapidement que la souche parentale. Des mutations sur la protéine M expliquent en partie la difficulté de certains mutants à causer l'apoptose, mais d'autres mutations interviendraient. L'identification d'autres mutations ajoutera à la compréhension du phénotype

d'infection particulier de ces variants et pourrait mener à la construction de VSV oncolytiques mieux adapter à la virothérapie oncolytique.

C'est dans cette optique que nous avons décidé de séquencer les génomes de variants phénotypiques du VSV afin de comprendre quelle (s) protéine (s) est responsable (s) de leur comportement.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Cancer et thérapies

1.1.1 Oncogenèse

Des études expérimentales ayant pour but d'induire un cancer chez différents modèles animaux ont montré qu'il n'existe pas de facteur ou mécanisme pouvant engendrer à lui seul une tumeur évidente. La carcinogenèse est un processus complexe qui peut être fragmenté en trois étapes soit l'initiation, la promotion et la progression. L'initiation est irréversible et consiste à endommager l'ADN par un agent physique (rayon U.V., X et gamma) ou chimique (agent alkylant, adduit, radicaux libres) ou encore par des erreurs dans le mécanisme de réparation ou la réplication. La mutation initiant un cancer se situe dans un gène impliqué dans la division cellulaire (oncogène) ou un gène codant pour un facteur suppresseur de tumeur ou encore les deux à la fois (Cooper, 2000).

La promotion se caractérise par la prolifération et la suppression de l'apoptose d'une cellule initiée. La promotion peut être stimulée par des molécules chimiques non carcinogènes (phénobarbital, DDT, ester de phorbol, biphenyl polybromé) (Trosko, 1996) ou une chirurgie (Trosko, 2003). L'hypothèse expliquant l'action de l'agent promoteur sur la division est qu'il inhibe les GJIC (*Gap Junction Intercellular Communication*) servant de ligne de communication entre les cellules (Yotti *et al.*, 1979; Trosko, 2003). Le rapprochement entre cancer et GJIC a été fait suite à l'observation selon laquelle les cellules cancéreuses ne répondent pas aux régulateurs de croissance ou à l'inhibition de contact, mécanismes normalement régulés par les GJIC. Pour

solidifier cette hypothèse, il a été démontré que la répression des gènes codant pour les GJIC (les gènes *connexins*) chez une cellule normale induit un phénotype comparable à une cellule tumorale et qu'à l'inverse une cellule cancéreuse restaure sa croissance contrôlée si transfectée avec un vecteur codant pour des gènes *connexins*. Les souris transgéniques ne portant pas le gène *connexin32* sont prédisposées à l'induction spontanée ou chimique du cancer du foie. De plus, les oncogènes *src*, *ras*, *mos* ainsi que la plupart des agents promoteurs répriment l'expression des GJIC.

L'interruption de la promotion met fin à la croissance de la tumeur ce qui en fait un processus réversible à la différence de l'initiation et la progression. À l'inverse, la présence soutenue de promoteur dirige la cellule initiée vers une augmentation de la prolifération donnant lieu à de nouveaux changements génétiques et épigénétiques. Ces altérations mèneront la tumeur au stade de la progression. À ce stade, les cellules se divisent sans l'aide d'agent promoteur endogène ou exogène. Le taux élevé de mutation des cellules transformées finira souvent par laisser place à l'invasion ou la métastase (Trosko *et al.*, 2004).

Génotypiquement, les cancers se ressemblent rarement voire jamais. Par contre, phénotypiquement les cellules cancéreuses ont quelques points communs. La plupart des cellules tumorales sont autosuffisantes en facteur de croissance, insensibles aux inhibiteurs de croissance, elles s'évadent du mécanisme d'apoptose, ont un potentiel réplicatif sans limite, soutiennent l'angiogenèse et finissent souvent par être invasives ou métastatiques. En dépit de leur diversité génotypique / phénotypique, les cellules composant une tumeur ont été dérivées d'une seule cellule.

1.1.2 La radiothérapie

La destruction des cellules tumorales par la radiothérapie se réalise suite au bombardement de rayonnement ionisant ou par des protons, électrons, pions, et neutrons (radiothérapie par les particules) (Schulz-Ertner *et al*, 2006). Cette énergie brise l'ADN des cellules cancéreuses qui meurent par incapacité à réparer leur matériel génétique alors que les cellules saines survivent. Plusieurs efforts ont été entrepris afin de minimiser le nombre de cellules saines affectées et l'arrivée de la technologie IMRT (Intensity Modulated Radiotherapy) y a contribué. Cet appareil envoie un rayon divisé en sous-rayons qui peuvent être modulés individuellement. De plus, le viseur peut couvrir tous les points sur une sphère virtuelle autour de la cible (Schlegel et Mahr, 2002). Dans le monde entier, sur 10 millions de nouveaux cas de cancers diagnostiqués par années, 30 à 50% reçoivent seul ou en combinaison à la chirurgie ou la chimiothérapie un traitement de radiothérapie (Porter *et al.*, 1999)

Sans nier l'efficacité, qui ne fait point de doute, de la radiothérapie, deux types de séquelles sont entraînées suite à ce traitement. D'un côté se trouvent les LENT (late effects on normal tissues) et de l'autre les « RISM » (radiation-induced second malignancies). Les LENT qui affectent 5-10% des gens ayant reçu un traitement de radiothérapie, sont des séquelles qui apparaissent ou n'ont pas encore disparues 90 jours après le traitement. Elles arrivent lorsqu'un trop grand nombre de cellules cruciales au bon fonctionnement d'un organe sont détruites. Les symptômes et la durée des LENT dépendent de l'organe ou tissu affecté et du type de cellules qu'il contient. Une toxicité aiguë des radiations affecte les organes ou tissus composés de cellules intermitotiques comme la peau et les muqueuses alors qu'une toxicité tardive touche les organes ou tissus composés de cellules post-mitotiques comme le foie, les reins, les poumons, le cœur, les muscles et les os. Les RISM à la différence des LENT surviennent des années après le traitement de radiothérapie et affectent 2-10% des patients. Connaissant l'effet des radiations sur une cellule et en se basant sur des études

épidémiologiques, ces cancers résulteraient d'une aberration chromosomique ou de mutations induites par les radiations. Aussi, plus un patient reçoit une dose importante de radiation plus les risques de voir naître un RISM sont élevés. Par exemple, il a été démontré qu'il y avait une relation directe entre l'application d'une forte dose de radiation au poumon pour un patient traité contre un lymphome de Hodgkin et le risque de voir renaître un autre cancer sur l'organe irradié (Gilbert et al., 2003). L'âge est également un facteur à considérer, car plus le patient est jeune plus le risque que le processus de carcinogenèse s'installe suite au traitement s'élève. Malgré tout, la radiothérapie reste un des traitements contre le cancer les plus efficaces et les bénéfices dépassent de loin les risques (Mohanti et Bansal, 2005).

1.1.3 La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement visant à détruire les cellules cancéreuses suite à l'utilisation de molécules chimiques bloquant le cycle cellulaire des cellules saines et tumorales. De la même manière que pour la radiothérapie, les cellules saines ayant des mécanismes de réparation fonctionnels réussissent à compléter le cycle cellulaire alors que les cellules tumorales incapables de se réparer sont détruites par apoptose (De Flora et Ferguson, 2005). Lorsque la réparation des cellules saines est plus rapide que la croissance de la tumeur, l'intervalle de temps entre chaque traitement peut être raccourci et si possible la dose augmentée ce qui accélère la guérison du patient (McKnight, 2003). Les agents chimiothérapeutiques sont classés en fonction de leur mécanisme d'action. Les agents alkylants (ex : cyclophosphamide, procarbazine et cisplatine) sont un large groupe de molécules qui causent la mort des cellules par le transfert d'un groupement alkyle (méthyl ou les groupes chloroéthylés) à l'ADN, causant l'inhibition de la réplication et de la transcription. Les inhibiteurs de topoisomérase (ex : étoposide, doxorubicine) empêchent la re-ligature de l'ADN par l'enzyme coupant le double-brin lors de la réplication en stabilisant la formation d'un complexe entre la protéine et l'ADN. Finalement, les anti-

métabolites miment des substances présentes naturellement dans l'organisme comme les nucléotides. L'incorporation de ces analogues de nucléotides dans l'ADN ou l'ARN bloque la synthèse de ces molécules empêchant la division cellulaire (Allan et Travis, 2005).

L'augmentation des risques de développer un second cancer a été rapportée suite à la prise de médicaments chimiothérapeutiques. C'est la principale cause de mortalité des gens ayant combattu un lymphome de Hodgkin grâce à la chimiothérapie (Aleman *et al.*, 2003). Il a été démontré que les inhibiteurs de topoisomérase induisent des translocations faisant naître des leucémies myéloïde et lymphoïde. La translocation la plus courante est celle entre le chromosome 9 et 11 (t(9;11)) et d'autres ont été notées comme t(15;17) et t(8;21). Les thérapies qui induisent des leucémies myéloïdes aiguës sont divisées en deux groupes; celles qui le développent suite à la prise d'inhibiteurs de topoisomérase et celles qui le développent par les agents alkylants ou la radiothérapie. Le premier groupe voit la maladie se manifester quelque mois à 5 ans après le traitement alors que l'autre groupe est atteint de la leucémie après 2 à 10 ans (Allan et Travis, 2005). Malgré les effets secondaires de ces molécules, elles sont une des causes du succès croissant de la lutte contre le cancer.

1.1.4 L'immunothérapie

Pour compléter l'effet des médicaments chimiothérapeutiques, il existe des greffes autologues de PBMC. Avant la chimiothérapie, un prélèvement de PBMC est exécuté sur le patient. Durant le traitement, les PBMC sont réinjectés au patient favorisant sa santé et les chances qu'une immunité s'installe contre son cancer. Des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de cellules cancéreuses sont aussi des armes utilisés contre le cancer lorsque possible. Également, plusieurs laboratoires tentent de mettre au point des vaccins anti-cancer en utilisant des cellules T ou des cellules dendritiques (Breckpot *et al.*, 2004 ; Michalek *et al.*, 2004). Chez des patients souffrant du cancer de la prostate,

une greffe de PBMC a été exécutée par une équipe de chercheurs. Seules les cellules dendritiques immatures triées des PBMC ont été conservées pour être ensuite transfectées avec des ARNm codant pour l'antigène PSA. Les cellules dendritiques devenues matures exposant maintenant à leur surface différents épitopes de PSA sur les CMH-I et II sont ensuite réinjectées aux patients (Heiser *et al.*, 2002). Une autre approche consiste à cloner les gènes codant pour les chaînes α et β du TCR de lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ spécifiques à un antigène de cellules cancéreuses dans une cellule T prélevée chez un patient. Ainsi, les cellules T exprimant les TCR spécifiques au cancer s'attaquent aux cellules exprimant l'antigène. En 2006, une équipe a réussi à transduire les chaînes α et β du TCR de lymphocytes spécifiques à l'antigène NY-ESO-1 dans des cellules T CD4⁺ appartenant à des patients souffrant d'un mélanome. Des tests *in vitro* ont confirmé la spécificité face à l'antigène NY-ESO-1 du TCR des cellules T CD4⁺ transduites (Zhao *et al.*, 2006).

1.2 Virus oncolytiques

Bien que plusieurs avancées aient été faites dans la thérapie contre le cancer, il y a encore un urgent besoin de nouveaux traitements en raison des dangers inhérents à la chimiothérapie (second cancer primaire) et la radiothérapie (LENT et RISM) mentionnés plus tôt. La virothérapie oncolytique est une thérapie anti-cancer qui reçoit une attention particulière et s'inscrit dans le cadre du présent projet. Cette méthode consiste à utiliser des virus se répliquant préférentiellement dans des cellules tumorales. L'absence de facteurs comme les interférons, de la protéine kinase R (PKR) et de facteurs suppresseurs de tumeur P53 et Rb sont les différences exploitées par ces virus. Il existe trois différents types de virus oncolytiques : ceux qui sont naturellement oncolytiques, ceux obtenus après des infections successives sur des tissus et ceux qui ont été génétiquement modifiés (Russell et Peng, 2007).

1.2.1 Virus oncolytiques naturels

Les virus naturels ou atténués qui présentent une plus grande aisance à se répliquer dans une cellule transformée sont le VSV, le virus des oreillons, le virus de la maladie Newcastle, le réovirus et le virus de la rougeole. Ces virus acquièrent leur spécificité pour les cellules tumorales par une dépendance envers soit l'oncogène ras, la protéine PKR ou les interférons (Davis et Fang, 2005). Par exemple, HSV-1 est un virus qui infecte préférentiellement les cellules surexprimant ras car elles sont déficientes en PKR (Liu *et al.*, 2003). Le mutant T1026 de VSV se réplique difficilement dans une cellule exprimant la protéine PKR et ayant une signalisation fonctionnelles par les interférons (Stojdl *et al.*, 2003).

1.2.2 Virus oncolytiques recombinants

Jusqu'à maintenant, les modifications des virus oncolytiques recombinants ont été apportées au niveau de la transcription, de la traduction, de l'attachement du virus à la cellule et de l'induction de l'apoptose. Dans le cas de la transcription, une modification peut être effectuée pour que l'expression des gènes viraux soit sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux cancers ou à un tissu en particulier. Les adénovirus (Ko *et al.*, 2005), HSV-1 (Chung *et al.*, 1999) et les rétrovirus ont subi ces modifications. Par exemple, une partie du LTR du rétrovirus de la leucémie murine (MLV) a été remplacée par un promoteur probasin spécifique aux cellules de la prostate (Logg *et al.*, 2002). Afin de cibler plus spécifiquement le cancer, un adénovirus portant un promoteur pour les gènes E1a et E1b (nécessaires à la réplication) spécifique à la transcriptase inverse de la télomérase humaine (hTERT) a été conçu. Un promoteur induit par cette enzyme permet au virus de discriminer plus aisément les cellules tumorales des cellules saines. Étant considérée comme une des étapes essentielles à la carcinogenèse, l'activité de hTERT est une cible de choix (Fujiwara *et al.*, 2007).

En virothérapie oncolytique, la défectuosité du système interféron des cellules cancéreuses est une des stratégies ciblée dans le contrôle de la traduction virale. Suite à une infection, les cellules sécrètent des interférons qui agissent de manière autocrine et paracrine. L'attachement de ces ligands (interférons de type I soit IFN- α/β) à leur récepteur induit la transcription de plusieurs gènes encodant pour des protéines comme PKR, OAS et MxA qui bloquent la réplication virale (Takaoka et Yanai, 2006). Pour favoriser la propagation de l'infection, certains virus oncolytiques naturels ou modifiés génétiquement suppriment cette réponse. C'est le cas du virus de la stomatite vésiculeuse. Le mutant T1026 du VSV à la différence du sauvage, permet à la cellule hôte de sécréter les interférons ce qui bloque sa réplication. Cette particularité de T1026 provient de la mutation M51R située sur la protéine de la matrice. En effet, il est admis qu'une des différences entre le mutant T1026 et le virus sauvage HR est due au fait que seule la réponse antivirale primaire est déclenchée chez HR. Cette réponse résulte de la phosphorylation par JNK de c-JUN, de IRF-3 et d'une autre protéine kinase (Sharma *et al.*, 2003) ainsi que la translocation de NF κ B au noyau induit par IKK (DiDonato *et al.*, 1997). Chez le mutant, la réponse primaire active la réponse secondaire qui consiste en l'expression de l'IFN- β qui à son tour entraîne l'expression de l'IFN- α (réponse tertiaire). Chez le type sauvage, l'attachement de la protéine M à NUP98, une nucléoporine, bloque le transport nucléocytoplasmique des ARN polyadénylés (Von Kobbe *et al.*, 2000) ce qui expliquerait en partie le blocage des réponses secondaire et tertiaire. La mutation M51R de M portée par le mutant T1026 empêcherait la liaison à NUP98, laissant la porte ouverte aux ARNm codant pour les interférons et les molécules effectrices. Pour ajouter à cela, un traitement à l'interféron prophylactique avant l'infection avec le virus sauvage protège les souris contre tout symptôme (Stojdl *et al.*, 2003).

La protéine PKR compte également parmi les différences existant entre les cellules tumorales et les saines. Dans le contexte d'une infection normale, une cellule en présence d'un virus se protégera via la PKR, qui, lorsqu'activée,

phosphoryle eIF-2, un facteur essentiel à l'initiation de la traduction. Plusieurs virus ont développé une habileté à s'évader de la PKR. En enlevant à un virus recombinant la capacité de bloquer l'action de la PKR, il est contraint à infecter les cellules inhibées en PKR. Les cellules cancéreuses exprimant un haut niveau de RAS ont peu de PKR, donc elles sont de parfaites candidates pour une infection par un virus n'ayant plus la capacité à inhiber PKR. Ce virus ne se répliquera pas dans une cellule normale en raison de l'expression normale de la PKR (Farassati *et al.*, 2001). Les adénovirus pour lesquels l'ARNm VA-I a été enlevé (Casallo *et al.*, 2003) et le virus influenza déficient en NS1 (Bergman *et al.*, 2003) sont des exemples de virus ayant été modifiés pour qu'ils ne puissent plus inhiber la PKR. Les virus appartenant à la famille herpès simplex, adénovirus, orthomyxovirus, paramyxovirus, poxvirus, picornavirus, réovirus et autres sont également utilisés pour la virothérapie oncolytique (Davis et Fang, 2005).

La troisième stratégie utilisée pour augmenter la spécificité du virus pour le cancer consiste à modifier les protéines impliquées dans l'attachement et l'internalisation du virus. Le virus de la rougeole (un Paramyxovirus du genre Morbillivirus) a été modifié pour s'attacher uniquement à des cellules exprimant des MMP (métalloprotéinases) associées aux tumeurs. Des domaines de liaison ou « linkers » ont été introduits dans les protéines responsables de la fusion (protéine F) afin qu'elles deviennent sensibles aux MMP. Ainsi, la maturation protéolytique de la protéine de fusion ne pouvait avoir lieu qu'en présence d'une forte expression de MMP associée aux tumeurs. Pour ajouter à cela, la protéine responsable de l'attachement du virus soit l'éhamaglutinine a été modifiée dans le but de ne s'attacher qu'à des TAA (Tumor Associated Antigen). Son affinité pour ses récepteurs d'origine (CD46 et SLAM) a été abolie en la mutant et une chaîne légère d'anticorps ou un ligand pour un récepteur associé aux tumeurs a été ajouté en C-terminal (Springfeld *et al.*, 2006). Le VSV a également été pseudotypé pour qu'il s'attache spécifiquement à des cellules tumorales. L'ectodomaine (E2) de la glycoprotéine (E1 + E2) du virus Sindbis a été remplacé par un récepteur à

portions Fc d'anticorps. Résultat : un VSV avec une glycoprotéine de Sindbis composé de E1 et d'un récepteur à portion Fc à la place de E2. L'infection par ces virus suivait l'ajout d'anticorps monoclonaux dirigés contre le TAA Her2/neu. Les virus infectaient plus favorablement les cellules portant un anticorps à leur surface (Bergman *et al.*, 2003).

Finalement, certains virus sont manipulés génétiquement pour causer spécifiquement l'apoptose des cellules cancéreuses. Les adénovirus y arrivent après que les gènes E1 soient mutés ou tout simplement délétés. Ces derniers codent pour des protéines essentielles à la propagation du virus (E1a et E1b) dans des cellules normales. Par contre, certaines cellules tumorales permettent aux virus de se reproduire sans difficulté même sans les gènes E1. Afin de garder les cellules métaboliquement actives, les protéines E1a et E1b ont pour rôle d'empêcher la cellule d'induire l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en inhibant respectivement les gènes suppresseurs de tumeurs p53 et Rb. Bref, en présence de p53 et Rb la cellule saine arrive à empêcher la réplication des mutants de E1. C'est ce qui a motivé la génération des adénovirus ONYX-015 et $\Delta 24$. ONYX-015 (délété pour le gène E1b) est le premier virus oncolytique à avoir été mis au point et utilisé en clinique (Mulvihill *et al.*, 2001). $\Delta 24$ est un autre type d'adénovirus qui infecte préférentiellement les cellules cancéreuses. Une délétion de 24 pb dans la région E1a lui vaut son nom et son potentiel oncolytique (Fueyo *et al.*, 2000). En Chine, l'adénovirus H101 type 5 est utilisé en combinaison avec la chimiothérapie contre les cancers de la tête et du cou (Yu et Fang, 2007). Le Tableau I présente d'autres virus employés dans la virothérapie oncolytique ainsi que leur mécanisme d'action.

Tableau I- Virus oncolytiques et leurs mécanismes d'action (Russell et Peng, 2007).

Family	Genome (kb)	Structure	Examples	Mechanism ^b
Adenoviridae	dsDNA 36-38	Non-enveloped Icosahedral 70-90 nm	Onyx-015 H8101 Ad-hTERT CG7870 Δ-24 RGD (E1A deleted)	3 (ΔE1B) 3 (ΔE1B, ΔE3) 1,3 (hTERT-E1) 1,3 (PSA-E1B, probasin-E1A) 3,4 (ΔE1B, avb3)
Herpesviridae	dsDNA 120-200	Enveloped 150-200	NV1020 G207 OncoVexGMCSF KeM34.5	2 (Δγ34.5) 2 (Δγ34.5, ΔICP6) 2 (Δγ34.5, ΔICP47) 1,2 (Mucashil-γ34.5)
Parvoviridae	ssDNA 5	Non-enveloped Icosahedral 18-26	H1	1 (P4 promoter)
Poxviridae	dsDNA 130-280	Enveloped 200 x 400	Vaccinia JX594-GM-CSF Vaccinia vSP Myxoma virus	2 (ΔTK) 3 (ΔSP1, ΔSP2) 2 (Akt, ERK)
Coronaviridae	+ssRNA 16-21	Enveloped 80-160	Murine hepatitis virus	4 (pseudoreceptor)
Orthomyxoviridae	-ssRNA 13.6	Enveloped 90-120	Feline infectious peritonitis virus Influenza A delNS1 virus	4 (EGFR adaptor) 2 (ΔNS1)
Paramyxoviridae	-ssRNA 16-20	Enveloped Helical 150-300	Mumps virus MV-CEA MV-NIS MV-EGFR, MV-CD38 MV-αFR	2 (IFN defects) 4 (CD46) 4 (CD46) 4 (EGFR, CD38) 4 (αFR)
Picornaviridae	+ssRNA 7.2-8.4	Non-enveloped Icosahedral 28-30	Newcastle disease virus PV701 Poliovirus PV1 (RIPO) Echovirus EV1 Coxsackie CVA21 Sonoma Valley virus	2 (IFN defects) 2 (HRV2 iRES) 4 (α2β1) 4 (ICAM-1, DAF) 4 (unknown receptor)
Reoviridae	dsRNA 22-27	Non-enveloped Icosahedral 80-80	Reovirus (Reolysin :)	2,4 (Ras, PKR, protease cleavage)
Retroviridae	+ssRNA 8	Enveloped Icosahedral 80-100	MLV (ACE-CD) MLV (ACE-Pb) MLV (AZE-ZZ-GFP)	Dividing cells 1 (probasin) 4 (HER2)
Rhabdoviridae	-ssRNA 11-12	Enveloped Helical 180 x 75	VSV-MΔ51 VSV-IFN-β	2 (matrix mutant) 2 (IFN defects)
Togaviridae	+ssRNA 12	Enveloped 80-70	Sindbis virus	4 (laminin receptor)

^aAbbreviations: DAF, decay accelerating factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; FR, folate receptor; HRV2 iRES, human rhinovirus type 2; hTERT, human telomerase promoter; ICAM, intracellular cell adhesion molecule-1; ICP, infected cell protein; NS1, nonstructural 1; PSA, prostate-specific antigen; SP1,2, viral serine protease inhibitors TK, thymidine kinase.

^bKey: 1, transcriptional targeting; 2, translational targeting; 3, pro-apoptotic targeting; 4, transductional targeting.

^cPresentation at the 4th International Conference on Oncolytic Viruses and Cancer Therapeutics, Arizona.

1.2.3 Les désavantages de la virothérapie oncolytique

Avant que l'utilisation de virus soit un traitement accepté dans le monde médical, plusieurs problèmes doivent être résolus. Entre autre, si l'hôte est séropositif pour le virus oncolytique, l'efficacité de l'infection est très réduite voire nulle, car les glycoprotéines masquées par les immunoglobulines ne peuvent s'attacher à leur récepteur. La dose est aussi un facteur limitant car si elle est trop

importante, une réaction immunitaire néfaste pour les patients pourrait se manifester. L'exposition de protéines virales par les CMH-I stimule l'immunité des cellules T cytotoxiques (CTL) ce qui réduit les chances de succès d'une deuxième exposition. Des craintes existent également envers l'idée que les virus oncolytiques pourraient se répandre dans une population et se recombinaison avec d'autres virus ou réacquérir les propriétés du virus sauvage. Finalement, le virus oncolytique devra être en mesure d'infecter un large spectre de types cellulaires pour viser le plus de cancer possible (Davis et Fang, 2005).

1.2.4 Solutions aux risques potentiels

Quelques solutions ont été proposées afin de diminuer les risques et d'augmenter les chances d'atteindre les cellules cibles suite à l'injection de virus. Ajouter un gène suicide au virus comme les systèmes de régulation Tet-off (Liu et *al.*, 2003), la recombinaison Cre (Flowers *et al.*, 1997) ou HSV-TK / ganciclovir (Smythe *et al.*, 1994) serait bénéfique si des complications survenaient. Pour augmenter le tropisme du virus, les acides aminés RGD ont été ajouté au récepteur à adénovirus. Cette modification a donné naissance à un virus ne se limitant plus à son récepteur CAR (*Cocksakie adenoviral receptor*) et s'attachant à des protéines plus ubiquistes comme les intégrines $\alpha V\beta 3$ ou $\alpha V\beta 5$ qui sont des récepteurs d'adhésion cellulaire servant entre autres aux leucocytes (Wu et *al.*, 2002).

1.3 Virus de la Stomatite Vésiculeuse (VSV)

1.3.1 Description

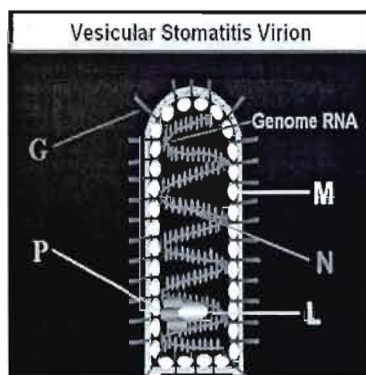


Figure 1. Représentation du virus de la stomatite vésiculeuse (Jayakar *et al.*, 2004).

Le VSV appartient au genre vésiculovirus de la famille des rhabdovirus. Les Rhabdovirus sont des virus enveloppés à ARN simple brin non segmenté de polarité négative. Le VSV transcrit cinq ARNm codant pour les protéines N (nucléocapside), P (phosphoprotéine), M (matrice), G (glycoprotéine) et L (protéine de polymérase) (Letchworth *et al.*, 1999) présenté dans la Figure 1. La protéine L et trois exemplaires de P forment la transcriptase, l'assemblage N-P-L donne lieu à la réplicase, G est la glycoprotéine de l'enveloppe et M est une protéine multi-fonctionnelle impliquée dans le bourgeonnement, l'assemblage et l'induction d'effets cytopathiques dont l'apoptose (Jayakar *et al.*, 2004).

1.3.2 Protéines N et P

La protéine de la nucléocapside du virus de la stomatite vésiculeuse fait partie des protéines se liant à l'ARN et forme un complexe à haut poids moléculaire encapsidant son génome afin qu'il soit résistant aux RNases.

moléculaire encapsidant son génome afin qu'il soit résistant aux RNases. Lorsqu'exprimée par un plasmide dans un système bactérien, de mammifère ou d'insecte, la protéine N forme une structure en quasi-hélice avec les ARN cellulaires (Green *et al.*, 2006). Récemment, des chercheurs suggéraient qu'une association intermoléculaire entre des protéines N était nécessaire à l'encapsidation de l'ARN viral. Pour le prouver, la nucléocapside du VSV sauvage et de mutants de N a été cristallographiée. Les résultats ont démontré que dix protéines N s'attachent pour former un oligomère ayant la forme d'un anneau. Le génome s'attache à la cavité se liant à l'ARN au centre de l'anneau qui est chargé positivement. Parmi les quatre mutants de N ($\Delta 1-22$; $\Delta 347-352$; $\Delta 320-324$, (Ala)₅, et S290W), seule la délétion $\Delta 347-352$ affaiblissait légèrement son attachement à la protéine P. La substitution d'une sérine pour un tryptophane au radical beaucoup plus imposant (S290W) n'altérerait pas l'interaction intermoléculaire avec d'autres protéines N, mais bloquait son attachement à l'ARN. À l'exception de la mutation S290W, les protéines N mutées avaient perdu leur capacité d'encapsider l'ARN et de s'oligomériser (Zhang *et al.*, 2008).

Lorsque la protéine de la nucléocapside est synthétisée par le ribosome, elle ne doit pas s'attacher à l'ARN afin qu'elle encapside correctement le génome du VSV. Individuellement, la protéine N n'arrive pas à se lier solidement à l'ARN, malgré la présence de la cavité se liant à l'ARN. La phosphoprotéine du VSV serait responsable d'une liaison adéquate entre N et l'ARN en agissant comme une chaperonine. Le complexe N-P permet à N d'être soluble dans le cytoplasme et la cristallographie du domaine d'oligomérisation de la phosphoprotéine suggère que N-P conduit la molécule N au site de réplication virale en formant un tétramère avec P associé à la protéine de la polymérase L qui est assise sur l'ARN (Zhang *et al.*, 2008).

La protéine P peut être divisée en trois domaines : le domaine N-terminal, central et C-terminal (Ding *et al.*, 2004). Le domaine N-terminal contient les résidus Ser60, Thr62 et Ser64 qui sont phosphorylés par des enzymes de la cellule

hôte et indispensables à l'activité transcriptionnelle de P (Chen *et al.*, 1997). De plus, c'est par cette région que la protéine N s'attache pour former le complexe N-P soluble. Fusionnés à la glutathione S-transférase, les quarante premiers acides aminés de N s'attachent à P (Chen *et al.*, 2007). Pour ce qui est du domaine C-terminal, il contient aussi des sites de phosphorylation (Ser226 et Ser227) qui sont nécessaires à une réplication optimale (Chen *et al.*, 1997). Il est également le principal site de liaison aux protéines N et L (Paul *et al.*, 1988) et l'insertion d'une mutation dans cette région abolit l'activité répllicationnelle de la phosphoprotéine (Das et Pattnaik, 2005). En absence des domaines N-terminal et central, le domaine C-terminal de P arrive aussi à s'attacher à N (Green *et al.*, 2000). Finalement, le domaine central fait le pont entre le domaine N-terminal et C-terminal et il assure la formation d'un dimère de P exposant deux portions C-terminales. Les domaines C-terminal au deux phosphoprotéines dimérisées agiraient comme deux pieds permettant à la polymérase de marcher le long du génome d'ARN du VSV, et ce par un mécanisme encore inconnu. À la différence de la réplication, les dimères de P ne seraient pas sollicités pour la transcription étant donné que le recrutement des N libres n'est pas requis dans cette étape. À l'inverse, la réplication nécessiterait la présence d'au moins un tétramère de phosphoprotéines qui pourrait lier à la fois le complexe N-ARN, L et recruter de nouvelles N libres pour couvrir tout le génome (Ding *et al.*, 2004).

1.3.3 Protéine M

1.3.3.1 Description et fonctions

La protéine de la matrice est la plus abondante (1800 molécules par virus) et la plus petite protéine (26 kDa) du virus de la stomatite vésiculeuse (Mc Creedy et Lyles, 1989). Cette protéine de 229 acide aminés fait le pont entre le cœur RNP et l'enveloppe virale en plus d'être considérée comme le moteur de l'assemblage et du bourgeonnement des virions (Rose et Whitt, 2001). La forme en balle de fusil des Rhabdovirus n'est possible qu'en présence de M. Il a été constaté qu'après une infection à la température restrictive avec des VSV portant une

protéine de la matrice sensible à la température, une forme sphérique ou pléiomorphe est observée et la production de nouveaux virus est faible (Lyles *et al.*, 1996).

1.3.3.2 Localisation

Elle se retrouve principalement dans le cytoplasme (environ 80%) et liée à la membrane plasmique ou à une membrane d'organelle (10-20%) (Ye *et al.*, 1994). Ces protéines M attachées au feuillet interne de la membrane plasmique seraient responsable de l'initiation de l'assemblage et du bourgeonnement. Le noyau des cellules infectées par le VSV contient également des protéines de la matrice (Lyles *et al.*, 1988; Glodowski *et al.*, 2002).

1.3.3.3 Les signaux de M

La distribution différentielle de la protéine M s'expliquerait par la présence de différents signaux trouvés sur cette dernière. La partie de la protéine responsable de son attachement aux membranes serait due à une région hautement basique située entre les acides aminés 88-129 (Gaudier *et al.*, 2002). La séquence d'acides aminés PPPY à la position 27-30 « late domain » est reconnue comme un motif interagissant avec des protéines cellulaires qui participent aux dernières étapes du bourgeonnement (la fission et la libération du virion de la membrane plasmique) (Harty *et al.*, 1999). Le nom « late domain » dérive du fait qu'une altération de ce dernier bloque le cycle viral dans ses dernières étapes. La séquence consensus du « late domain » peut également être composée des acides aminés PSAP et elle se retrouve chez plusieurs familles de virus comme les Rétrovirus, les Filovirus et bien sûr les Rhabdovirus. Les protéines cellulaires s'attachant au « late domain » du VSV sont TSG101, VPS4, « ESCRT-I vacuolar protein sorting machinery » et « WW-domain ubiquitin ligases » (Pornillos *et al.*, 2002).

La protéine de la matrice contient aussi deux NLS. Le premier est situé entre les acides aminés 23-57 et l'autre entre les acides aminés 47-229. Sa méthionine à la position 51 est essentielle à la localisation de la protéine M au complexe du pore nucléaire ainsi que pour l'inhibition du transport nucléocytoplasmique (Petersen *et al.*, 2000). L'équipe de Fontoura en 2005 a démontré que l'inhibition du transport nucléocytoplasmique résulte de l'attachement de M à la protéine Rae1 et à la nucléoporeine NUP98. Ils ont aussi démontré que la mutation M51R sur la protéine M (portée par T1026) empêche l'attachement à Rae1. Sans le complexe M-Rae1, l'attachement à NUP98 est avorté et l'inhibition du transport nucléocytoplasmique est levée (Faria *et al.*, 2005).

1.3.3.4 Inhibition de la transcription et de la traduction

Il est maintenant admis qu'une infection par le VSV inhibe l'expression des protéines de l'hôte au niveau de la transcription et de la traduction. La protéine de la matrice est responsable de l'inhibition de TFIID, un complexe de l'ARN polymérase II (ARNPII). Ce facteur composé de protéines TAF (TBP Associated Factor) et d'une TBP (TATA box Binding Protein) initie la transcription. Contrairement à la protéase 3C du poliovirus, M n'agit pas directement sur ce facteur. En effet, il n'est pas possible de bloquer l'activité de TFIID suite à l'ajout de la protéine de la matrice (employée seule) sur des extraits nucléaires. En contrepartie, l'ARN polymérase II (ARNPII) isolée de cellules infectées par le VSV, mise en solution avec tous les facteurs nécessaires à la transcription, n'arrive pas à produire des ARNm contrairement à l'ARNPII recombinante ou isolée de cellules saines (Yuan *et al.*, 1998). Toujours dans le but de voir un lien direct entre M et l'inhibition de la transcription, des tentatives pour co-immunoprécipiter le facteur TBP et M ont été réalisées et les résultats se sont avérés négatifs. Considérant ce bilan, la protéine M pourrait indirectement inhiber TFIID en activant un facteur inhibiteur de la cellule hôte (Lyles, 2000).

En ce qui a trait à la traduction, elle est bloquée par l'altération du complexe d'initiation eIF4F après une infection par le VSV. Ce complexe multiprotéique est formé par la protéine eIF4E, la protéine structurale eIF4G, l'hélicase eIF4A, la kinase MNK1 et d'autres protéines (Gingras *et al.*, 1999). Le VSV bloque la traduction des ARNm de l'hôte en induisant la déphosphorylation de eIF4E qui empêche l'attachement de eIF4F à la coiffe 5'. Dans ces conditions, le complexe ribosomique 40S ne peut donc pas se lier à l'ARNm. Plusieurs mécanismes semblent contribuer à cette déphosphorylation, incluant l'activation de la protéine eIF4EBP1/PHAS1 qui, en se liant à eIF4E, entraîne sa dissociation de eIF4F (Connor et Lyles, 2002).

D'autres études ont tenté de démontrer en vain des différences entre les ARNm du VSV et ceux de l'hôte pour comprendre ce qui avantage la traduction des ARNm viraux. Finalement, il a été supposé qu'un élément structurel agissant *in cis* (non basé sur la séquence) pourrait conférer l'avantage aux ARNm viraux (Whittlow *et al.*, 2006). Plus récemment, la même équipe a démontré que le VSV traduit plus favorablement les ARNm nouvellement transcrits c'est à dire après l'infection que ceux avant l'infection, plus âgés. En effet, après avoir transfecté, à divers temps avant et après l'infection, des ARNm de EGFP, les chercheurs ont constaté que la traduction de ces ARNm était inhibée lorsque la transfection avait lieu avant l'infection. À l'inverse, la traduction des ARNm entrés dans la cellule après l'infection n'était pas inhibée (Whitlow *et al.*, 2008).

1.3.4 Protéine G

1.3.4.1 Rôles

La glycoprotéine du VSV est responsable de l'attachement du virus au récepteur et de la fusion de la membrane virale avec celle de la membrane de l'endosome et d'une partie du bourgeonnement. L'attachement du trimère de protéine G à son récepteur, encore inconnu, induit la formation d'un puits de

clathrine qui aboutit en endosome (Sun *et al.*, 2005). Les pompes à H⁺ de l'endosome précoce abaissent le pH ce qui pousse la protéine G à changer de forme pour la préparer à la fusion. Après la fusion, la glycoprotéine du VSV revient à un environnement de pH 7 qui lui confère une nouvelle structure (Roche *et al.*, 2007).

1.3.4.2 Les structures de G

Les différents environnements auxquels la protéine G est soumise la poussent à se métamorphoser en trois différentes structures ayant des différences biochimiques et biophysiques (Clague *et al.*, 1990). L'état natif ou l'état de la pré-fusion qui se produit à un pH 7; l'état hydrophobe activé qui se produit optimalement à un pH 6 et qui permet l'amorçage de la première étape de la fusion (Durrer *et al.*, 1995); l'état de la post-fusion qui est un antigène distinct des deux autres états. Ces états s'appliquent au Rhabdovirus comme le virus de la rage et le VSV (Roche et Gaudin, 2002). À la différence d'autres familles de virus (entre autre « influenza Ha strain X-31 ») (Carr et Kim, 1993), le changement conformationnel induit par un abaissement de pH est réversible ce qui fait que la protéine native n'est pas métastable. En fait, cette réversibilité est essentielle car après avoir passé par le compartiment acide qu'est l'appareil de Golgi, il est important que la protéine retrouve sa structure native à sa sortie (Gaudin *et al.*, 1995). Alors que la plupart des protéines virales responsables de la fusion sont classées dans des groupes structuraux bien connus (Glycoprotéine de classe I ou II), les travaux sur la protéine G du VSV ont fait naître une nouvelle classe de protéines de fusion soit la classe III (Weissenhorn *et al.*, 2007).

1.3.4.3 L'anatomie de G

La glycoprotéine du VSV peut être décomposée en trois parties. À l'extérieur du virus se trouve l'ectodomaine qui est la partie la plus imposante de la protéine avec ses 446 acides aminés sur un total de 495 pour la souche Indiana

(après le clivage du peptide signal). Elle traverse la membrane plasmique via son unique chaîne transmembranaire qui sert d'ancrage. Finalement, plongé dans le cytoplasme se trouve le domaine cytoplasmique soit le signal de reconnaissance du complexe ARN-N, une étape essentielle au bourgeonnement (Roche *et al.*, 2007). La protéine G acquiert sa stabilité lorsqu'elle est disposée en trimère. C'est dans cette forme qu'elle est trouvée à la surface des cellules infectées et dans l'enveloppe du virus (Jayakar *et al.*, 2004).

1.3.4.4 Effet sur le bourgeonnement

L'efficacité de bourgeonnement du virus de stomatite vésiculeuse est due à une interaction de la protéine de la matrice avec la protéine G. Des expériences sur des mutants du VSV, caractérisés par des délétions dans le domaine cytoplasmique et l'ectodomaine de G, ont démontré que le bourgeonnement peut être réduit de trente fois (Schnell *et al.*, 1998 ; Robison et Whitt, 2000). L'importance de la protéine G a été renforcée avec la preuve que G a une activité de bourgeonnement intrinsèque. En effet, après la transfection d'ARN codant pour VSV-G et un autre encodant la réplicase du SFV, des particules enveloppées d'une membrane et transpercées de protéine G ont été récoltées dans le surnageant cellulaire (Rolls *et al.*, 1994).

Récemment, les résultats d'une recherche ont permis de faire le pont entre toutes les études qui ont tenté de comprendre le processus du bourgeonnement du virus de la stomatite vésiculeuse. Les chercheurs ont démontré que la protéine M et la protéine G ne se retrouvent pas dans le même microdomaine de la membrane plasmique. À l'aide de la microscopie électronique et grâce à des anticorps monoclonaux portant une particule d'or, les chercheurs ont élaboré un modèle du principe du bourgeonnement qui propose que la première étape soit l'association du complexe ARN-N au microdomaine de la protéine G. La protéine M contenue dans un microdomaine voisin s'associerait avec le complexe ARN-N attaché au

microdomaine de la protéine G ce qui mènerait à la fusion des microdomaines M et G et au même moment de la forme en balle de fusil (Swintec et Lyles, 2008).

1.3.5 Protéine L

1.3.5.1 Rôles et structure

La transcription et la réplication du génome du VSV sont effectuées en grande partie grâce à la protéine L. Comme il a été précédemment mentionné, cette protéine de la polymérase dépendante de l'ARN s'associe à P pour jouer son rôle de transcriptase. Plus tard durant l'infection, lorsqu'il y a suffisamment de N dans le cytoplasme, cette dernière s'associe à P (L-P₄) qui est liée au complexe ARN-N pour former la réplicase (Ding *et al.*, 2004). De plus, elle ajoute aux ARNm viraux une coiffe 5' qu'elle méthyle et une queue poly-(A). La structure que prend l'énorme protéine L composée de 2109 acides aminés (241 kDa) est acquise grâce à son cofacteur P (Emerson et Wagner, 1972). À l'intérieur du virus se trouve environ cinquante exemplaires de transcriptase qui sont solidement attachés au cœur RNP. Dans un système *in vitro*, la protéine L suffit à la transcription et à la réplication, preuve qu'aucune protéine cellulaire n'est requise (Jayakar *et al.*, 2004).

1.3.5.2 Phylogénie

Les séquences codant pour la protéine L de cinq virus à ARN simple brin de polarité négative non-segmentés ont été comparées afin de voir si elles sont conservées. Les représentants de la famille des Rhabdovirus étaient le VSV et le virus de la rage alors que les Paramyxovirus étaient représentés par le virus de la maladie Newcastle, le virus de la rougeole et le virus Sendai. Les séquences des familles de virus étaient caractérisées par la présence de plusieurs blocs d'acides aminés conservés et éparpillés à travers des séquences variables. La comparaison de ces séquences a solidifié l'idée selon laquelle le virus de la rage (RV) qui

appartient au genre *Lyssavirus* est plus proche du virus de la rougeole que du VSV, qui lui, appartient au genre *Vésiculovirus*. Malgré tout, les similitudes dans la séquence de la protéine L suggèrent que les cinq virus auraient un ancêtre commun (Poch *et al.*, 1990).

1.3.5.3 Les particularités de la coiffe 5' des ARNm viraux

Les virus à ARN négatif non-segmenté se distinguent de certains virus à ADN et à double brin d'ARN comme respectivement le virus de la vaccine et les Réovirus et aussi des cellules eucaryotes par leur manière unique d'ajouter une coiffe à l'extrémité 5' des ARNm natifs. L'étape cruciale pour la formation de la coiffe consiste à ce qu'à l'extrémité 5' de l'ARNm se trouve un guanosine triphosphate qui sera ultérieurement méthylé. Contrairement à la manière plus usuelle qui repose sur l'ajout d'un GMP à un GDP situé à l'extrémité de l'ARNm, les virus à ARN négatif non-segmentés ajoutent un GDP à un GMP à l'extrémité de l'ARNm (Ogino et Banerjee, 2007). Récemment, la même équipe a publié un article qui suggère que le GTP provient non pas de l'attachement d'un GDP au GMP, mais d'un GTP au GMP donnant lieu à un guanosine tétraphosphate. Le phosphate gamma du triphosphate attaché au GMP serait par la suite clivé par une GTPase pour revenir à l'essentiel GTP (Ogino et Banerjee, 2008).

1.3.6 Pathologies associées au VSV

Les *Vésiculovirus* infectent les vertébrés et les invertébrés. Parmi les vertébrés, se trouve l'homme et principalement les animaux de la ferme tels que les porcs, les chevaux, les bovins. En général, la pathologie associée à une infection par le VSV est la maladie de la stomatite vésiculeuse qui se caractérise chez le bétail par des lésions au niveau des lèvres, du palais, de la langue, des gencives et des mamelons (Flanagan *et al.*, 2001). Chez l'homme, une conjonctivite précède souvent les symptômes de la maladie. Devant cette observation, l'hypothèse d'une infection débutant au niveau de la conjonctive a

été émise. Après l'infection, des symptômes semblables à influenza apparaissent : fièvre, frissons, nausée, vomissements, mal de tête, pharyngite, conjonctivite (Roberts *et al.*, 1999).

1.3.7 Inducteur d'apoptose

La protéine de la matrice portant la mutation M51R n'interfère pas dans le trafic des ARNm cellulaires y compris ceux codant pour les interférons. La forte présence d'interférons protège en retour la cellule et ses voisines contre l'infection ce qui expliquerait la difficulté du mutant T1026 à induire l'apoptose dans certaines lignées. L'accumulation d'antiviraux grâce aux pores nucléaires laissés ouverts par la protéine M mutée ne serait pas l'unique cause de la difficulté à induire l'apoptose (Stojdl *et al.*, 2003).

Les cellules neurales humaines H4 infectées par le variant phénotypique TP6 dont la protéine M est sauvage, accumulent autant les interférons que T1026 et sont conduites plus rapidement vers l'apoptose que les cellules infectées par le sauvage. Suite à un immunobuvardage révélant la diminution de la procaspase-3 et l'augmentation de la caspase-3 activée 18h post-infection sur des cellules H4, le variant TP6 a présenté une bande caspase-3 activée nettement supérieure à celle du sauvage (Desforges *et al.*, 2002). Le phénotype d'infection particulier de TP6 suppose la présence d'une mutation encore inconnue qui sera révélée lors du séquençage du génome entier.

1.3.8 Potentiel oncolytique

L'oncolyse, le ciblage des cellules cancéreuses et la dispersion du virus dans la masse cancéreuse ont été comparés pour neuf virus dans des expériences *in vitro* et *in vivo* sur des cellules du glioblastome, un type de tumeur cérébrale, et VSV était parmi les quatre présentant les meilleurs résultats (Wollmann *et al.*, 2005). Récemment, un laboratoire canadien a comparé *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*

le VSV et le réovirus sur différentes lignées de gliome et VSV a montré un pouvoir oncolytique supérieur (Lun *et al.*, 2006).

1.3.9 Avantages du VSV en virothérapie oncolytique

Le VSV est une arme de choix en virothérapie oncolytique, car peu de gens ont des anticorps contre ses antigènes ce qui facilite une première infection. Pour la même raison, le titre viral nécessaire au succès de la thérapie est inférieur diminuant les risques de causer un choc anaphylactique. Suite à une injection des souches T1026 et TP3 du VSV dans la veine de la queue de souris Balb/c, aucun symptôme de maladie n'est perceptible. Une réversion n'est pas dramatique pour ce rhabdovirus car l'infection initiale par le mutant (T1026 ou TP3) induit les interférons et reproduit l'ajout d'interféron prophylactique (Stojdl *et al.*, 2003).

La simplicité de son génome est également un avantage car cela simplifie les manipulations génétiques. De plus, il peut intégrer un fragment pouvant aller jusqu'à 40 % de son génome sans altération de sa forme (Roberts *et al.*, 1998). Les risques d'intégration dans un proto-oncogène sont absents étant donné qu'il est fait d'ARN et se réplique dans le cytoplasme.

Un autre aspect qui avantage le VSV est qu'il infecte une grande variété de types cellulaires. Le récepteur de l'attachement du virus a été présumé comme étant la phosphatidylsérine (Schlegel *et al.*, 1983), mais récemment des expériences menées sur diverses cellules sélectionnées selon la quantité de phosphatidylsérine ont démontré que le titre viral n'augmentait pas en fonction de la quantité de phosphatidylsérines (Coil et Miller, 2004). Pour confirmer l'absence de corrélation entre ce phospholipide et l'entrée du virus, les phosphatidylsérines ont été bloquées par l'annexine V et les titres viraux étaient aussi élevés que le contrôle. Cette macromolécule située principalement dans le feuillet interne de la membrane plasmique pourrait, suite à un attachement avec la protéine G, être responsable de la fusion avec l'endosome (Coil et Miller, 2004).

Récemment, une équipe canadienne a administré systématiquement à des souris « nude » 1×10^9 PFU du mutant T1026 du VSV et 60 jours plus tard les souris étaient toujours vivantes. Suite à une analyse immunohistochimique aucun virus a été trouvé dans le foie, les poumons, les reins et le cœur des souris. Par contre, des virus ont été trouvés dans le cerveau quelques heures après l'injection pour ensuite disparaître (Lun *et al.*, 2006).

1.3.10 Désavantages du VSV en virothérapie oncolytique

Une infection par le VSV a été suspectée comme étant la cause du lupus érythromateux systémique (SLE) chez certains sujets. Le SLE est une maladie auto-immune systémique qui s'attaque aux RNP comme la chromatine. Des associations entre les protéines N et M de VSV et des auto-anticorps ont été démontrées. Un épitope majeur de la protéine Ro / SSA partage sept acides aminés sur 8 avec un épitope de la protéine N du VSV (sérotipe Indiana) (Scofield et Harley, 1991). Il a été démontré que 41,5% des patients atteints de lupus érythromateux avaient des anticorps anti-Ro / SSA s'attachant à N et que 59,3% des anticorps s'attachant aux complexes RNP se liaient également à M (Hardgrave *et al.*, 1993). Un autre événement laissant croire qu'il existe une relation entre le VSV et le SLE est le fait que la partie du transcrit nommée « leader » du VSV a été immunoprécipitée par un anticorps anti-La de patients souffrant du SLE suite à des infection de cellules BHK-21 (Kurilla et Keene, 1983).

Une autre conséquence de l'utilisation du VSV (plus précisément le mutant T1026) en virothérapie oncolytique est qu'il persiste et cause une maladie neurologique chez des souris nouveaux-nés, plus tard après l'infection (Stanners et Goldberg, 1975). G31, un autre mutant du VSV, est capable de persister dans des BHK-21 (Villarreal et Holland, 1976) et des cellules s'apparentant aux oligodendrocytes durant 4 ans (Huprikar *et al.*, 1986).

1.3.11 Utilisation d'un recombinant du VSV

La construction d'un VSV exprimant une cytokine est une idée qui s'est concrétisée au moment où un premier VSV recombinant a été construit. La particularité de la construction d'un VSV recombinant à ARN négatif est que l'ADNc du génome du VSV et sa polymérase n'arrive pas à produire des virions comme dans le cas des virus à ARN positif. La polymérase du VSV transcrit le génome seulement lorsque les protéines N y sont attachées pour former la nucléocapside. Les virus sont donc générés par l'expression de l'ADNc de l'antigénome et des ADNc des gènes codant pour les protéines formant la polymérase (N, P et L) (Lawson *et al.*, 1995 ; Whelan *et al.*, 1995).

L'étape suivant la mise au point d'un protocole pour créer un recombinant à partir d'un virus à ARN négatif était d'y ajouter une molécule amplifiant son pouvoir oncolytique. Les premiers VSV recombinants furent armés du gène de l'IL-4 et du gène de la TK. Ces gènes ont été clonés entre les séquences codant pour G et L de l'ADNc du VSV (Fernandez *et al.*, 2002). En 2003, soit un an plus tard, le même laboratoire introduit le gène de l'interféron- β (Obuchi *et al.*, 2003). Dans chacun des cas, le pouvoir oncolytique a été augmenté significativement, l'expression des nouveaux gènes était élevée et les titres obtenus étaient comparables à leur homologue sauvage.

Initialement, ce projet consistait à ajouter la cytokine interleukine-12 (IL-12) entre les séquences codant pour G et L du VSV. Cependant, avant que le projet soit terminé, un article sur ce sujet a paru en janvier 2007 (Shin *et al.* 2007). L'idée était de combiner le pouvoir intrinsèque du VSV à détruire spécifiquement les cellules cancéreuses et le pouvoir d'une cytokine qui lorsqu'injectée intratumoralement arrive à induire la destruction entière ou partielle de certains types de cancer ainsi qu'une immunité (Gao *et al.*, 2005).

L'IL12 se distingue par ses puissantes propriétés inflammatoires et sa capacité à induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Elle stimule la dégranulation des neutrophiles, la formation de médiateurs lipidiques et l'activation des systèmes de coagulation et fibrinolytique qui ensemble favorisent la présentation des antigènes associés aux tumeurs (Trinchieri, 2003). L'IL-12 a été identifiée comme étant un adjuvant puissant dans une variété de modèle de vaccination contre des maladies infectieuses. De plus, elle active directement et indirectement les neutrophiles et les cellules NK à sécréter des substances qui altèrent le microenvironnement tumoral et stimulent l'expression de molécules d'adhésion qui interviennent dans le trafic des cellules présentatrices d'antigènes et les cellules immunitaires spécifiques (Cavallo *et al.*, 1997). Bref, le VSV recombinant exprimant la cytokine IL-12 a bel et bien démontré son avantage sur l'oncolyse par rapport au VSV employé seule (Shin *et al.*, 2007).

1.4 But

Le but du projet présenté ici est d'ouvrir le chemin à la compréhension du phénotype d'infection qui distingue des mutants spontanés du VSV Indiana HR. Le séquençage de la souche parentale HR, de quatre mutants thermorésistants (T1026R1, TP3R1, TP5R1 et TP6R1) ainsi que leur homologue thermosensible (T1026, TP3, TP5 et TP6) devrait nous révéler les mutations responsables de leur comportement particulier et celles responsables de la thermorésistance vs thermosensibilité. L'impact de ces mutations sera évalué grâce à la littérature disponible et à l'aide d'outil d'analyse de structure secondaire et tertiaire des protéines.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Cellules et culture cellulaire

Les cellules épithéliales de rein Vero qui origine du singe Africain vert poussent en monocouche au fond de pétris de plastique (Sarstedt, Montréal, Québec). Elles ont été cultivées dans un milieu DMEM (HyClone) avec 10% (v/v) de sérum fœtal de veau à 37°C dans une atmosphère humide, composée à 5% de CO₂. Le milieu a été supplémenté avec de la L-Glutamine (2 mM) (Gibco™) et du pyruvate de sodium (1 mM) (Hyclone).

2.2 Souches virales

La souche virale HR (heat resistant) est dérivée du virus de la stomatite vésiculeuse appartenant au sérotype Indiana et à la souche San Juan. Cette souche virale est connue pour inhiber rapidement l'expression de gènes de l'hôte (PSI+ pour *protein synthesis inhibitor* ou P+) ce qui bloque la réponse à l'interféron de la cellule. Les mutants T1026, TP3, TP5 et TP6 (T : Toronto) sont des mutants thermosensibles spontanés de la souche parentale HR. Ils ont été isolés grâce à leur capacité à induire l'expression d'IFN β et d'inhiber ou non les gènes cellulaires (fonction P). Les mutants T1026R1, TP3R1, TP5R1 et TP6R1 ont été isolés à partir de leur homologue thermosensible (T : Toronto; R : thermorevertant) (Francoeur *et al.*, 1987).

Les mutants T1026, T1026R1, TP3 et TP3R1 sont incapables d'inhiber l'expression des gènes de la cellule hôte (P-), mais poussent la cellule à sécréter de l'IFN β . La mutation M51R sur T1026 et T1026R1 a été identifiée sur leur

protéine de la matrice. La mutation portée par T1026 et T1026R1 rend, à elle seule, ces mutants incapables d'inhiber l'expression des gènes de la cellule hôte (P-) (Kopecky *et al.*, 2001). Les mutations V221F et S226R sur la protéine M de TP3 et TP3R1 ont également été identifiées (Beausoleil, 1994). Rien ne prouve qu'elle sont les seules responsables du phénotype d'infection atténué de ces virus. Les mutants TP5, TP5R1, TP6 et TP6R1 ont, quant à eux, été isolés parce qu'ils inhibent plus fortement l'expression des gènes de la cellule hôte que la souche parentale HR (P++) (Francoeur *et al.*, 1987).

2.3 Infection

Les cellules ont étéensemencées dans des pétris de 100 mm, et ce 12h avant l'infection, de manière à atteindre une confluence d'environ 75% le jour de l'infection. Le milieu de culture a été retiré et le virus, préalablement dilué dans un milieu DMEM contenant 5% de sérum fœtal (v/v) a été déposé sur les cellules dans un volume de 1000 µL. Toutes les infections ont été effectuées à MOI de 10. Le temps d'adsorption a été de 45 minutes à l'incubateur (37°C, atmosphère 5% CO₂). Par la suite, 4 ml de milieu DMEM ayant servi à la dilution des virus a été ajouté (5 mL final) dans chacun des pétris de 100 mm. Les cellules infectées ont été gardées à 37°C, dans une atmosphère 5% CO₂ jusqu'à la récolte.

2.4 Récolte

Lors de la récolte, le surnageant de cellules infectées a été transféré dans un tube de 15 mL (Sarstedt). Ce tube a été déposé sur glace. Les cellules adhérentes ont été décollées avec 2 ml de trypsine (1X dilué dans le PBS). Un volume de 4 ml de milieu DMEM avec 5% de sérum de veau fœtal a été utilisé pour faciliter la récolte des cellules. Les cellules, la trypsine et le milieu ont été déposés dans le même tube de 15 mL qui contenait le surnageant. Les tubes furent centrifugés 5 minutes à 600 x g. Les culots cellulaires ont été lavés deux fois avec 5 mL de PBS (4°C), puis conservés à -80°C.

2.5 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux contenus dans les culots de cellules VERO infectées par le VSV HR et ses mutants conservés à -80°C ont été isolés grâce au kit d'extraction E.Z.N.A. Total RNA Kit (OMEGA BIO-TEK).

2.6 RT-PCR

Les ARNs totaux provenant de cellules VERO infectées avec le VSV HR et ses mutants ont servi à la réalisation de la transcription inverse du génome entier des VSVs. L'amorce RT (BioCorp, Montréal, Qc) (Tableau II) s'hybride à l'extrémité 3' du génome des différents VSV. La transcription inverse du génome de 11.1 Kb a été effectuée à 50°C durant une heure avec la Transcriptor-Reverse-Transcriptase (Roche) après une dénaturation de 10 minutes à 65°C . Une quantité de 2 μg d'ARN totaux de cellules infectées VERO a été utilisée avec une concentration de 1,25 μM d'amorce.

En utilisant la séquence génomique du VSV Indiana appartenant à la souche San Juan (GI: 9627229), une amorce a été synthétisée pour l'obtention d'un ADNc du génome du VSV et dix autres amorces (Tableau II) ont été synthétisées pour constituer cinq produits de PCR soit NPMG, GL, L1, L2, L3. L'obtention d'un PCR efficace a requis de nombreuses mises au point pour chacune des paires d'amorce et leur segment correspondant. Pour alléger la présentation, nous ne présentons que les PCR optimisés après ces mises au point. Les conditions finales retenues sont décrites ici. Le segment NPMG de 4,6 Kb a été amplifié grâce aux amorces NPMG1 et NPMG2 (1,25 μM) à une température de dénaturation de 92°C durant 20 secondes, de 52°C pour l'hybridation durant 30 secondes et de 68°C durant 4min 30s pour l'allongement. Le segment L1 de 3,4 Kb a été amplifié avec les amorces L1a et L1b à une température de dénaturation de 92°C durant 20 secondes, de 50°C pour l'hybridation durant 30 secondes et de 68°C durant 3min 30s pour l'allongement. En ce qui a trait à L2

(3,1 Kb), les amorces L2a et L2b ont permis l'amplification. La température de dénaturation était de 92°C durant 20 secondes, celle pour l'hybridation était de 50°C durant 30 secondes et l'allongement a été fait à 68°C durant 3min 10s. Le segment GL (1,7Kb) a été amplifié avec les

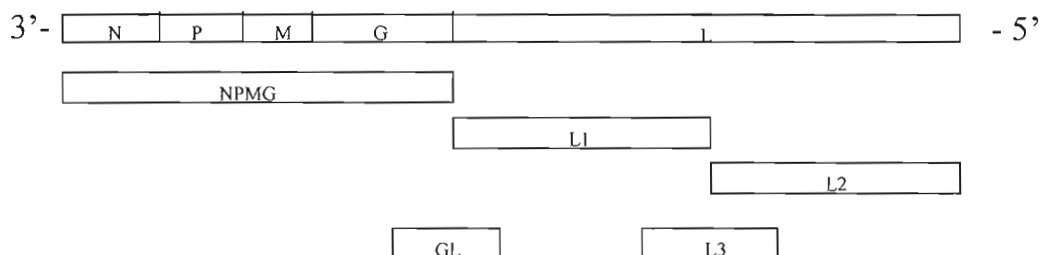


Figure 2 : Schéma des cinq produits de RT-PCR utilisés pour le séquençage.

amorces GL1 et GL2 à une température de dénaturation de 94°C durant 30 secondes, de 50°C pour l'hybridation durant 30 secondes et 68°C durant 1min 50s pour l'allongement. Finalement, L3 (2,4 Kb) a été amplifié avec les amorces L3a et L3b à une température de dénaturation de 94°C durant 30 secondes, de 50°C pour l'hybridation durant 30 secondes et 68°C durant 2min 30s pour l'allongement. Toutes les amplifications ont été exécutées durant 30 cycles avec l'enzyme FidelitaqTM DNA polymerase (USB Corporation).

Tableau II. Séquence des amorces utilisées pour la transcription inverse et l'amplification par PCR du génome du VSV HR et ses mutants. Le génome a été amplifié en cinq segments dénommés NPMG, GL, L1, L3 et L2.

Nom de l'amorce	Séquences
RT	5'- ACGAAGACAAACAAACCATTATT - 3'
NPMG1	5'- GCAGGGCCCCACGAAGACAAACAAACCATTAT - 3'
NPMG2	5'- GGACCTCGAGGATTGCTGTTAGTTTTTTTCATAA - 3'
GL1	5' - GATAAGGATCTCTTTGCTGC - 3'
GL2	5' - GATATTTAGAAGGGAGAAGAT - 3'
L1a	5'- CCGACTAGTGCTCAAAGAGGCCTCAATTA - 3'
L1b	5' - AGGGGATCATGTAAAATGTG - 3'
L2a	5'- ATACCCACTTGTGCTAATATAA - 3'
L2b	5'- GGACGGCCGACGAAGACCACAAAACCAG - 3'
L3a	5' - ATACCCACTTGTGCTAATATAA - 3'
L3b	5' - CTTCCCCAAGGGGGATAGCT - 3'

Tableau III. Séquence des amorces utilisées pour le séquençage des segments NPMG (a), GL(b), L1(c), L3(d), L2(e) qui composent le génome du VSV HR et ses mutants. Les amorces paires couvrent le génome et les impaires l'antigénome.

a)

N1 (NPMG)	5' - ACGAAGACAAACAAACCATTAT - 3'
N2 (NPMG)	5' - GAACATGTCCACTGCAGCGA - 3'
N3 (NPMG)	5' - ATGTTCTTCCACATGTTCAAAA - 3'
N4 (NPMG)	5' - TCATTTGTCAAATTCTGACTTA - 3'
N5 (NPMG)	5' - TAAACATCGGGAAAGCAGGG - 3'
N6 (NPMG)	5' - AGAGCTGTCAATTGCCCCCA - 3'
P1 (NPMG)	5' - ATGGATAATCTCACAAAAGTTC - 3'
P2 (NPMG)	5' - CTACAGAGAATATTTGACTCT - 3'
P3 (NPMG)	5' - TGTACGCTTATGCAGTAGGA - 3'
P4 (NPMG)	5' - TCAGCTTCTGGATCCTGTG - 3'
M1 (NPMG)	5' - ATGAGTTCCTTAAAGAAGATTC - 3'
M2 (NPMG)	5' - TCATTTGAAGTGGCTGATAGA - 3'
M3 (NPMG)	5' - GAGTGCACATTTGAAGCATC - 3'
M4 (NPMG)	5' - CGGACGATTAGATCTAACCG - 3'
G1 (NPMG)	5' - ATGAAGTGCCTTTTGTACTTA - 3'
G2 (NPMG)	5' - AGCCATCTCGAACCAGACA - 3'
G3 (NPMG)	5' - GATAAGGATCTCTTTGCTGC - 3'
G4 (NPMG)	5' - TTACTTTCCAAGTCGGTTCA - 3'
G5 (NPMG)	5' - ACCAGAGCACTTCAGAAGAC - 3'
G6 (NPMG)	5' - AGATGGAGTGAAGGATCGG - 3'
G7 (NPMG)	5' - ATGCAGCAATTACATATGCCC - 3'
G8 (NPMG)	5' - TTGGAGCAGCAATATCGACT - 3'

b)

L17 (GL)	5' – ACATTCAAGACGCTGCTTCG – 3'
L18 (GL)	5' – CTCAAGAACTCCATCCCAGT – 3'
L1 (GL)	5' – ATGGAAGTCCACGATTTTGA – 3'
L2 (GL)	5' – GATATTTAGAAGGGAGAAGAT – 3'

c)

L3 (L1)	5' – AGAATTGGAGATAAAATTGTGG – 3'
L4 (L1)	5' – CTTCAAGTTCCCTCTCCTTTC – 3'
L5 (L1)	5' – GCAGGTAGATTTTCTCCCT – 3'
L6 (L1)	5' – ATATTAGCACAAAGTGGGTATTT – 3'
L7 (L1)	5' – ATACCCACTTGTGCTAATATAA – 3'
L8 (L1)	5' – TTTTACATGATCCCCTTCTC – 3'
La (L1)	5' – CGAACATATGCAGGATTAGG – 3'
Laa (L1)	5' – GACCCCAATGTCTGAACGA – 3'
Lb (L1)	5' – CCACAGCTGCTCAAGTTCA – 3'
Lbb (L1)	5' – TGATTGGCTATGCAAATTGCC – 3'
Lc (L1)	5' – TTGTAGAATTACAGGGTGCTC – 3'
Lcc (L1)	5' – GGAAGGGTCCAAATACAACAT – 3'

d)

L9 (L3)	5' – AGGGGATCATGTAAAATGTG – 3'
L10 (L3)	5' – CTCTTGTCCTCCACGAACCTT – 3'
Ld (L3)	5' – TCATGAAGAGGATCGGCTCA – 3'
Ldd (L3)	5' – AGATAAGCAGGCAATGGTCC – 3'
Le (L3)	5' – GCTCTATGCTCAAATTACCAC – 3'
Lee (L3)	5' – CAAACCTCCGTACACTGC – 3'

e)

L11 (L2)	5' – AAACAGATCTATCCTTTAGAAG – 3'
L12 (L2)	5' – CTTCCCCAAGGGGATAGCT – 3'
L13 (L2)	5' – ATTACAACAATCCCTGTTTATTA – 3'
L14 (L2)	5' – TGCTCTGGCAAATTCCTGTT – 3'
L15 (L2)	5' – AAGGTTAGTACATACTTTACCT – 3'
L16 (L2)	5' – ACGAAGACCACAAAACCAGA – 3'
Lf (L2)	5' – TGAGTTGAGAGAGCTGGCAA – 3'
Lff (L2)	5' – CGCATGACGACCCTGATAA – 3'
Lg (L2)	5' – GAATGCAGTAACAATCCTTGG – 3'
Lgg (L2)	5' – GAGGTATCGGTCCTACTCT – 3'

2.7 Purification de l'ADN

Les puits d'un gel d'agarose 1% ont été chargés avec la totalité des tubes contenant la réaction d'amplification soit 50µL. Après une électrophorèse d'une heure trente à 100V, les gels ont été exposés sous la lampe U.V. et la bande amplifiée a été découpée avec une lame stérile. L'ADN contenu dans les blocs de gels a été élué grâce à un « gel extraction kit » (QIAGEN). Un volume de 2µL d'ADN purifié est déposé dans un gel d'agarose 1% pour évaluer la pureté des échantillons. La migration est effectuée durant 1 h à 100 V.

2.8 Séquençage

Les amplicons NPMG, GL, L1, L3 et L2 ont été séquencés grâce aux amorces de séquençage (BioCorp, Montréal, Qc) du Tableau III. Une quantité de 1µg d'ADN purifié sur gel et provenant d'un RT-PCR (200 ng / µL) a été déposée sur une plaque de 96 puits à fond en V. Un volume de 5µL d'amorce à 20 µM a été déposé sur une autre plaque en V. Les deux brins d'ADN (dans l'orientation 3'-5' et 5'-3') des cinq amplicons ont été séquencés par le centre de séquençage Génome Québec (Montréal, Qc) à l'aide du « 3730xl DNA Analyzer systems » et de la technique « Dye Terminator » (Applied Biosystems).

2.9 Analyse des séquences nucléotidiques et des protéines

Après que la souche parentale ait été révélée, chacun des génomes des mutants a été comparé à celle-ci avec l'outil d'analyse génétique DIFFSEQ (EMBOSS). Chaque SNP a été confirmé au minimum deux fois, c'est à dire sur le génome et l'antigénome. Ensuite, les cartes du VSV HR et ses mutants ont été changés en séquence peptidique avec l'outil NEBcutter V2.0 (New England Biolabs). Chacune des cinq protéines des mutants thermosensibles et thermorésistants du VSV a été comparée aux protéines de la souche parentale HR avec l'outil d'alignement de séquences protéiques SIM (EXPASY).

2.10 Analyse des structures secondaires et tertiaires des protéines

Les structures secondaires des protéines du VSV HR et ses huit mutants ont été révélées grâce à l'outil GOR IV SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD qui fonctionne d'après la méthode de Garnier, Gibrat et Robson (Garnier *et al.*, 1996). Les structures tertiaires des protéines G ont été réalisées avec PyMOL Molecular Graphics System.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

L'objectif de la présente étude était de déterminer la ou les mutation(s) responsable(s) du phénotype d'infection des mutants TP5, TP5R1, TP6 et TP6R1 du VSV par rapport à la souche parentale HR. La ou les mutations responsables du passage de la thermorésistance à la thermosensibilité des mutants devaient aussi être révélée(s). Outre les mutations connues M51R de T1026 thermorésistant et thermosensible et V221F et S226R de TP3 thermorésistant et thermosensible sur la protéine M, l'objectif de ce travail était d'identifier d'autres mutations portées par ces virus qui participeraient à leur faible effet cytopathique sur certaines lignées cellulaires.

3.1 Séquence en acides aminés des protéines du VSV wt HR et ses mutants thermosensibles et thermorésistants.

Le VSV est un virus à ARN négatif simple brin. Afin d'obtenir des amplicons pouvant ensuite être séquencés, le génome de 11,1 kb a été inversement transcrit et amplifié. Des enzymes haute-fidélité ont été utilisées pour les deux opérations. En utilisant la séquence génomique du VSV Indiana appartenant à la souche San Juan (GI: 9627229), une amorce a été synthétisée pour l'obtention d'un ADNc du génome du VSV et dix autres amorces ont été synthétisées pour constituer cinq produits de PCR soit NPMG, GL, L1, L2, L3.

Après l'amplification et la purification sur gel des ADNc des mutants thermosensibles (Figure 3) et thermorésistants (non présenté), la pureté des amplicons et la quantité ont été évalués sur gel d'agarose 1%. Les bandes qui correspondent en partant de la gauche à celle des mutants T1026, TP3, TP5 et TP6

sont bien distinctes et la taille des fragments est connue grâce au marqueur Lambda.

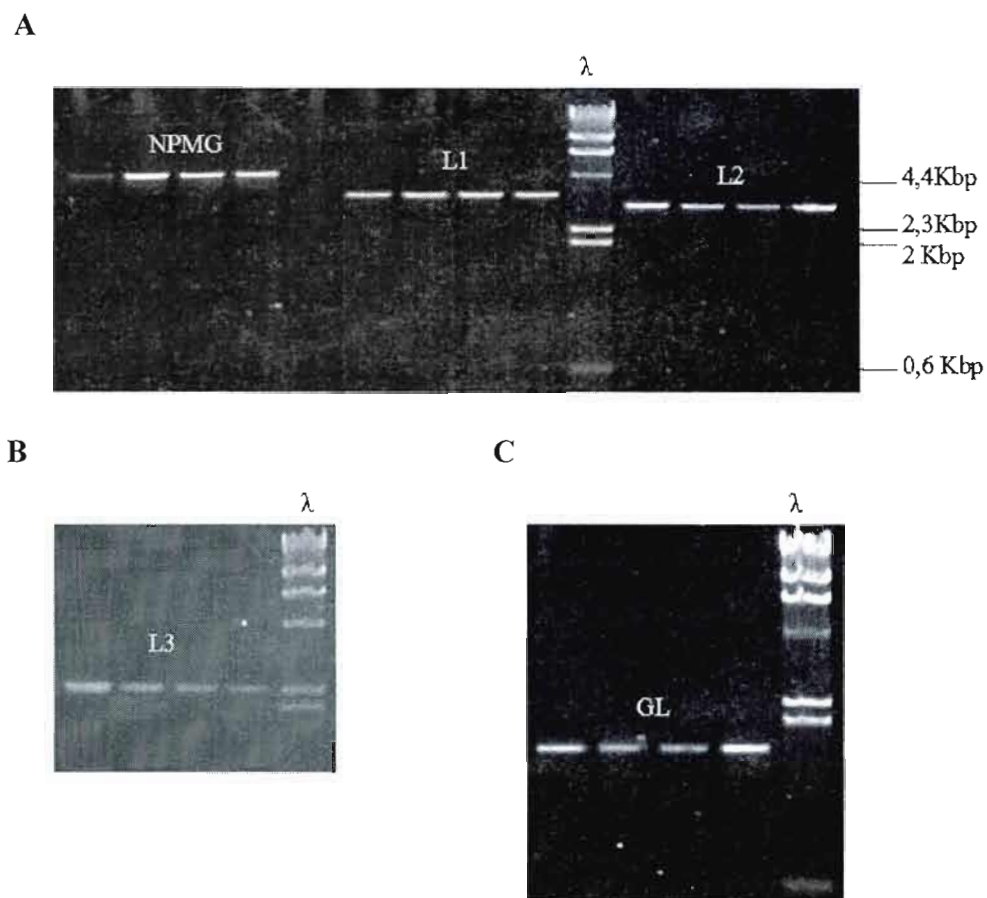


Figure 3. Migration sur gel d'agarose 1% de cinq produits de RT-PCR correspondant au génome de mutants thermosensibles du VSV purifiés sur gel. Les RT-PCR ont été fait avec les ARN totaux extraits de cellule VERO infectées avec, de gauche à droite sur chaque gel, les mutants T1026, TP3, TP5, TP6. Les cellules infectées ont été récoltées 12 hre post-infection. (A) L'amplicon NPMG (4,6 Kpb) correspond aux gènes codant pour les protéines N, P, M et G. Les fragments L1 (3,4 Kpb) et L2 (3,1 Kpb) correspondent au gène codant pour la protéine L. (B) Le fragment L3 (2,4 Kpb) correspond à la partie centrale du gène codant pour L. (C) Le fragment GL (1,7 Kpb) correspond à la fin du gène codant pour G et le début de celui codant pour L. L'ADN du phage λ digéré par HindIII a servi comme marqueur de longueur d'ADN et quelques valeurs sont affichées en A.

Le fragment de RT-PCR NPMG fait 4,6 kbp, L1 fait 3,4 Kbp, L2 fait 3,1 Kbp, L3 fait 2,4 Kbp et finalement GL fait 1,7 Kbp. Les tailles obtenues pour ces cinq fragment d'ADN correspondent à ce qui est attendu. En général, peu d'ADN étranger est présent dans les puits, preuve que la purification sur gel est adéquate.

Le séquençage des huit mutants du VSV et la souche parentale VSV wt HR San Juan a été exécuté par le centre Génome Québec qui utilise une adaptation de la technique de Sanger dénommé « Dye Terminator ». Afin de séquencer la totalité de leur génome, vingt-quatre amorces ont été synthétisées et le même nombre ont été construites pour l'antigénome.

Les figures 4 à 8 présentent les mutations de quatre mutants du VSV thermosensibles et quatre mutants thermorésistants sur les protéine N, P, M, G et L. Les comparaisons se font avec la souche parentale HR et le VSV wt San Juan dont HR est dérivé. La Figure 4 montre la séquence de la protéine N du mutant TP3R1 ainsi que San Juan. À la position 153, l'arginine est remplacée par une lysine qui est aussi un acide aminé alcalin. La sérine située à la position 353 sur le VSV wt HR est mutée pour une asparagine sur la souche TP3R1 et également Indiana San Juan . La mutation S353N est comme la première mutation, une mutation conservatrice.

En ce qui a trait à la protéine P présentée à la figure 5, les mutants du VSV à l'exception de TP3R1 n'ont aucune mutation. L'acide aminé sérine à la position 189 est remplacé par une tyrosine. La conséquence est que le groupement hydroxyle sur le radical de la sérine est remplacé par un phénol. Parmi les onze mutations identifiées entre le VSV HR et le VSV wt San Juan, six mutations sont non-conservatrices soit Q111P, L126S L141S H152Y, K170E et N237D. Les autres mutations sur la phosphoprotéine sont R50K, V76A, P77Q, D100E et I168M.

	1-----155-----353-----422	
HR	R	S
SJ	K	N
T1026R1		
T1026		
TP3R1	K	N
TP3		
TP5R1		
TP5		
TP6R1		
TP6		

Figure 4. Séquence en acides aminés de la protéine N du VSV-Indiana wt HR et ses mutants thermosensibles (T1026, TP3, TP5, TP6) et thermorésistants (T1026R1, TP3R1, TP5R1, TP6R1). La substitution des acides aminés de HR est représentée. Les chiffres représentent la position des acides aminés. La souche San Juan est aussi représentée. L'absence de symboles signifie que l'acide aminé est identique à HR.

	1	50	76	77	100	111	126	141	152	168	170	189	237	265
HR	R	V	P		D	Q	L	L	H	I	K	S		N
SJ	K	A	Q		E	P	S	S	Y	M	E			D
T1026R1														
T1026														
TP3R1												Y		
TP3														
TP5R1														
TP5														
TP6R1														
TP6														

Figure 5. Séquence en acides aminés de la protéine P du VSV-Indiana wt HR et ses mutants thermosensibles (T1026, TP3, TP5, TP6) et thermorésistants (T1026R1, TP3R1, TP5R1, TP6R1). La substitution des acides aminés de HR est représentée. Les chiffres représentent la position des acides aminés. La souche San Juan est aussi représentée. L'absence de symboles signifie que l'acide aminé est identique à HR. Les mutations non-conservatrices sont présentées en rouge.

La protéine de la matrice de quatre mutants du VSV a été mutée une fois ou plus par rapport à la souche parentale HR (figure 6). Les mutants T1026 et T1026R1 ont une méthionine non-polaire à la place d'une arginine chargée positivement à la position 51. À la différence de T1026, le T1026R1 a une mutation conservatrice V225I. Les mutants du VSV wt HR TP3 et TP3R1 ont une mutation conservatrice (V221F) et une non-conservatrice (S226R). La version thermorésistante de TP3 a une mutation K5R, absente chez le thermosensible. Le VSV San Juan a six acides aminés différents de ceux de HR. Les acides aminés asparagine (#32), alanine (#133), histidines (#154 et 157) et valines (#171 et 225) sont remplacés respectivement par une sérine, une thréonine, une tyrosine, une asparagine, deux isoleucines. De toutes ces mutations, seules A133T, H154Y et H157N sont non-conservatrices.

La figure 7 présente les mutations de la protéine G des différents VSV. Cette protéine est la plus touchée par les mutations. Les mutants T1026, T1026R1 et SJ ont une alanine non-polaire à la place d'une sérine polaire à la position 431 et à la position 487 une tyrosine polaire est mutée pour une histidine chargée positivement. Une mutation conservatrice R242H a également été révélée pour les mêmes mutants. Le mutant T1026R1 a une mutation non-conservatrice Q26R que n'a pas le thermosensible T1026. TP3 et TP3R1 sont aux antipodes en ce qui a trait à G. Le thermorésistant est le porteur du plus grand nombre de mutations alors que le thermosensible n'en a aucune. De ces six mutations appartenant à TP3R1, la moitié sont non-conservatrice c'est à dire Y24H, Q26R et K92E et les autres sont V14M, R242H et F469C. Les mutants TP5 et TP5R1 ont deux mutations communes soit E254Q qui a pour conséquence le changement d'un acide glutamique chargé négativement par l'acide aminé polaire glutamine. L'autre mutation, K116R, est conservatrice. Les mutants TP6 et TP6R1 ont une mutation commune soit E254G qui a pour conséquence le changement d'un acide glutamique chargé négativement pour une glycine non-polaire. À l'exception de TP3, l'acide aspartique chargé négativement à la position 232 est changé par une glycine non-polaire chez tous les thermosensibles y compris le VSV San Juan.

	1-----5-----32-----51-----133-----154-157-----171-----221-225-226-229
HR	K N M A H H V V V S
SJ	S T Y N I I
T1026R1	R I
T1026	R
TP3R1	R F R
TP3	F R
TP5R1	
TP5	
TP6R1	
TP6	

Figure 6. Séquence en acides aminés de la protéine M du VSV-Indiana wt HR et ses mutants thermosensibles (T1026, TP3, TP5, TP6) et thermorésistants (T1026R1, TP3R1, TP5R1, TP6R1). La substitution des acides aminées de HR est représentée. Les chiffres représentent la position des acides aminés. La souche San Juan est aussi représentée. L'absence de symboles signifie que l'acide aminé est identique à HR. Les mutations non-conservatrices sont présentées en rouge.

	1	14	24	26	57	92	96	116	141	171	232	242	254	331	431	438	453	469	487	511
HR	V	Y	Q	L	K	H	K	A	D	D	R	E	V	S	T	F	F	Y		
SJ	H			I		Q		V	Y	G	H		A		S	L			H	
T1026R1			R								H			A					H	
T1026										G	H			A					H	
TP3R1	M	H	R		E						H							C		
TP3																				
TP5R1								R						Q						
TP5								R			G			Q						
TP6R1														G						
TP6										G				G						

Figure 7. Séquence en acides aminés de la protéine G du VSV-Indiana wt HR et ses mutants thermosensibles (T1026, TP3, TP5, TP6) et thermorésistants (T1026R1, TP3R1, TP5R1, TP6R1). La substitution des acides aminées de HR est représentée. Les chiffres représentent la position des acides aminés. La souche San Juan est aussi représentée. L'absence de symboles signifie que l'acide aminé est identique à HR. Les mutations non-conservatrices sont présentées en rouge.

Enfin, plusieurs différences sont présentées entre la protéine G du VSV wt HR et le VSV San Juan. Parmi les dix mutations identifiées, quatre sont non-conservatrices (Y14H, H96Q, D171Y et D232G) et six sont conservatrices (L57I, A141V, R242H, V331A T438S et F453L).

À la figure 8, trois mutants présentent des différences dans la séquence en acide aminé de la protéine L. L'acide aminé #296 qui est une arginine est remplacé par une lysine chez les mutants TP3R1 et T1026. Le VSV San Juan a aussi la mutation conservatrice R296K. Pour ajouter à cette mutation, T1026 porte la mutation H114Q qui a pour conséquence le changement d'un acide aminé chargé positivement (H) pour un acide aminé polaire (Q). Finalement, l'alanine #826 est modifiée pour une valine chez T1026. Le mutant TP3R1 a sept mutations dont quatre sont non-conservatrices et trois sont semblables au VSV San Juan. L'arginine chargée positivement à la position 269 est remplacée par une sérine polaire. L'acide aminé #367 est une alanine au radical non-polaire chez la souche parentale HR alors que chez TP3R1 c'est une thréonine polaire. Les mutations E2054K et R2085G apparaissent également. Ici, un acide glutamique chargé négativement est remplacé par une lysine chargée positivement (E2054K) et une glycine non-polaire prend la place d'une arginine chargée positivement (R2085G). Les autres mutations de TP3R1 sont L202I, R296K, V2003I. La protéine L du VSV San Juan et celle de HR présentent six mutations. Les mutations non-conservatrices sont A367T comme TP3R1 et I2026T qui a pour conséquence le changement d'une isoleucine non-polaire pour une thréonine polaire. Semblable à TP3R1, la souche Indiana San Juan a révélé les mutations L202I et R296K. Finalement, une arginine (#269) a été mutée pour une sérine, une sérine pour une alanine (#826) et une lysine pour une arginine (#2075) toujours pour la souche San Juan du VSV Indiana.

	1	114	202	269	296	367	689	826	2003	2026	2054	2075	2085	2109
HR	H	L	R	R	A	S	A	V	I	E	K	R		
SJ		I		K	T	T			T		R			
T1026R1														
T1026	Q			K				V						
TP3R1		I	S	K	T				I		K		G	
TP3														
TP5R1														
TP5														
TP6R1														
TP6														

Figure 8. Séquence en acides aminés de la protéine L du VSV-Indiana wt HR et ses mutants thermosensibles (T1026, TP3, TP5, TP6) et thermorésistants (T1026R1, TP3R1, TP5R1, TP6R1). La substitution des acides aminées de HR est représentée. Les chiffres représentent la position des acides aminés. La souche San Juan est aussi représentée. L'absence de symboles signifie que l'acide aminé est identique à HR. Les mutations non-conservatrices sont présentées en rouge.

3.2 Prédiction des structures secondaires du VSV wt HR et ses mutants thermosensibles et thermorésistants.

D'après la séquence en acides aminés de la souche parentale HR et ses mutants, des prédictions concernant les structures secondaires ont été faites sur les protéines N, P, M, G et L grâce à la dernière version de la méthode Garnier, Osguthorpe et Robson (Garnier *et al.*, 1996). La méthode GOR de 1978 a été développée peu de temps après la méthode de Chou et Fasman. Ces méthodes sont basées sur des paramètres de probabilité tirés de données empiriques provenant de la cristallographie de structures tertiaires de protéine. La méthode GOR, à la différence de Chou-Fasman, prend en compte non seulement la propension d'acides aminés individuels de former des structures secondaires particulières, mais aussi la probabilité conditionnelle de l'acide aminé pour former une structure secondaire donnée que ses voisins immédiats ont déjà formé (Garnier *et al.*, 1978). La première version de la méthode GOR tenait compte des « turns » alors que la nouvelle version n'en tient plus compte étant donné la grande variabilité de ces régions. De plus, la nouvelle méthode n'introduit une hélice alpha que si elle fait au minimum quatre acides aminés et un feuillet beta que s'il a une longueur de deux acides aminés (Garnier *et al.*, 1996). La méthode GOR a été privilégiée devant Predictprotein, car l'algorithme de ce logiciel ne se prononce pas sur la structure secondaire de plusieurs acides aminés. Les structures annoncées avec la méthode Predictprotein était très similaire à celles projetées par la méthode GOR qui a l'avantage de se prononcer sur tous les acides aminés.

La figure 9 présente les prédictions des protéines N, P, M, G et L du VSV wt HR et ses mutants thermosensibles et thermorésistants. Les effets possibles sur les protéines du VSV sont représentés par une réaction dans laquelle se trouve à gauche de la flèche la structure secondaire du wt HR et à droite celle du mutant indiqué. Les mutations présentes sur les figure 4 à 8 et absentes dans la figure 9 n'ont aucune conséquence sur la structure 2D des protéines. Les prédictions n'ont pas été faites pour le VSV Indiana San Juan.

Les protéines N et P du mutant TP3R1 subissent un léger changement par rapport à la souche parentale HR. En ce qui a trait à N, une hélice alpha est introduite dans un long « coil » suite à la mutation R155K. Du côté de P, après la mutation S189Y, un feuillet beta s'est introduit dans un « coil » et le feuillet beta qui le précède est raccourci de deux acides aminés.

La structure secondaire de la protéine M est très conservée chez tous les mutants étudiés dans ce projet. La mutation K5R de TP3R1 induit la perte d'un acide aminé à un feuillet beta et V225I de T1026R1 modifie la structure d'un « coil ». Quant aux mutations V221F et S226R de TP3 et TP3R1, elles provoquent l'allongement d'un « coil » en N-terminal et aussi le prolongement du feuillet beta.

La protéine présentant le plus grand nombre de mutations est G. Malgré ces modifications, tout comme les autres, elle reste très conservée. Les mutations V14M, Y24H, K92E, D232G, R242H et Y487H n'altèrent que légèrement la structure secondaire de G. Seules les mutations E254G retrouvées sur TP6 et TP6R1 ainsi que F469C appartenant à TP3R1 affectent la structure bidimensionnelle. La mutation E254G induit le prolongement d'un « coil » au dépend d'une hélice alpha. En effet, six acides aminés appartenant à une hélice alpha sont inclus dans un « coil ». Malgré cette différence, les acides aminés conservés G et W qui apparaissent en gris dans la figure 9 sont disposés de la même manière que HR. À la position 469 de la protéine G, le changement d'une phénylalanine pour une cystéine provoque la même altération que E254G sauf qu'une partie de l'hélice alpha retrouvée chez HR se change en feuillet beta.

Finalement, la protéine de la polymérase L n'est mutée que chez les mutants T1026 et TP3R1. Les deux premières mutations de L apparaissant dans la figure 9 soit H114Q de T1026 et R269S de TP3R1 affectent peu la structure bidimensionnelle de cette protéine. Par contre, A367T retrouvée sur TP3R1 transforme une hélice alpha de huit acides aminés en un feuillet beta et un

« coil ». La mutation R2085G sur TP3R1 change une hélice alpha pour un feuillet beta et un « coil ». De plus, cette mutation provoque l'allongement d'une hélice alpha.

Figure 9. Structures secondaires des protéines N, P, M, G, et L du VSV-Indiana wt HR et des mutants du VSV-Indiana thermosensibles T1026, TP3, TP5, TP6 et thermorésistants T1026R1, TP3R1, TP5R1, TP6R1 prédites par la méthode de Garnier, Gibrat et Robson (1996). La structure secondaire du VSV wt HR (à gauche) est comparée à celle altérée par une mutation (à droite). Les mutations sont indiquées au dessus de la flèche. La lettre **H** représente une hélice alpha, la lettre **E** représente un « extended strand » et la lettre **C** représente un « random coil ». L'acide aminé muté apparaît en caractère gras. Les acides aminés en gris de la protéine G signifient qu'ils sont conservés chez trois Vésiculovirus.

Protéine N

HR PEYRKRLMDGLTNQCKMI R155K PEYRKRLMDGLTNQCKMI TP3R1
 HHHHHHHHHHCCCCCCCCC HHHHHHHHHCCCCCHHHH

Protéine P

HR YKVTPVMNTHPSQSE S189Y YKVTPVMNTHPYQSE TP3R1
 EEEEEEECCCCCCC EEECCCECCCCCEE

Protéine M

HR MSSLRKILGLK K5R MSSLRKILGLK TP3R1
 CCCCCEEEEEEC CCCCCEEEEEEC

HR WVLDSVSHFK V225I WVLDSISHFK T1026R1
 EEEEECCCEEE EEEEECEEC

HR KASGAWVLDSVSHFK V221F S226R KASGAWFLDSVRHFK TP3R1 TP3
 HCCCCCEEEEECCCEEE CCCCCCEEEEEEEEC

Protéine G

HR FIGVNCKFTIVFPY V14M Y24H FIGMNCKFTIVFPH TP3R1
 ECCCCCEEEEEEC CCCCCCEEEEEEC

HR DFRWYGPKYITHSIRS K92E DFRWYGPEYITHSIRS TP3R1
 CCCCCCEEEEEEEEC CCCCCCEEEEEEEEC

HR RSNYFAYETGDK D232G RSNYFAYETGGK T1026 TP5 TP6
 EECCEEEEECCC EEEEEEECCC

HR QYCKRWGVRLPSGVW R242H QYCKHWGVRLPSGVW T1026 T1026R1 TP3R1
 CCCCCCEEEEECCCC CCCCCCEEEEECCCC

HR PS V FEMADKDLFAAA E254G PS V FGMADKDLFAAA TP6 TP6R1
 CCCCCHHHHHHHHHH CCCCCCCCCCHHHHHH

HR KSSIASFFFIIGLII F469C KSSIASFCFIIGLII TP3R1
 HHHHHHHHHHHHHHHH CCCCCCEEEEEEC

HR LFLVLRVGIYLCI Y487H LFLVLRVGIHLICI T1026 T1026R1
 HHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHCHHH

Protéine L

HR SFLHEVDKEAEITF H114Q SFLQEVVDKEAEITF T1026
 HHHHHHCCHHHHHH HHHHHHHHHHHHHH

HR YRIGDKIVE R269S YSIGDKIVE TP3R1
 HCCCCEEEE HCCCCEEEE

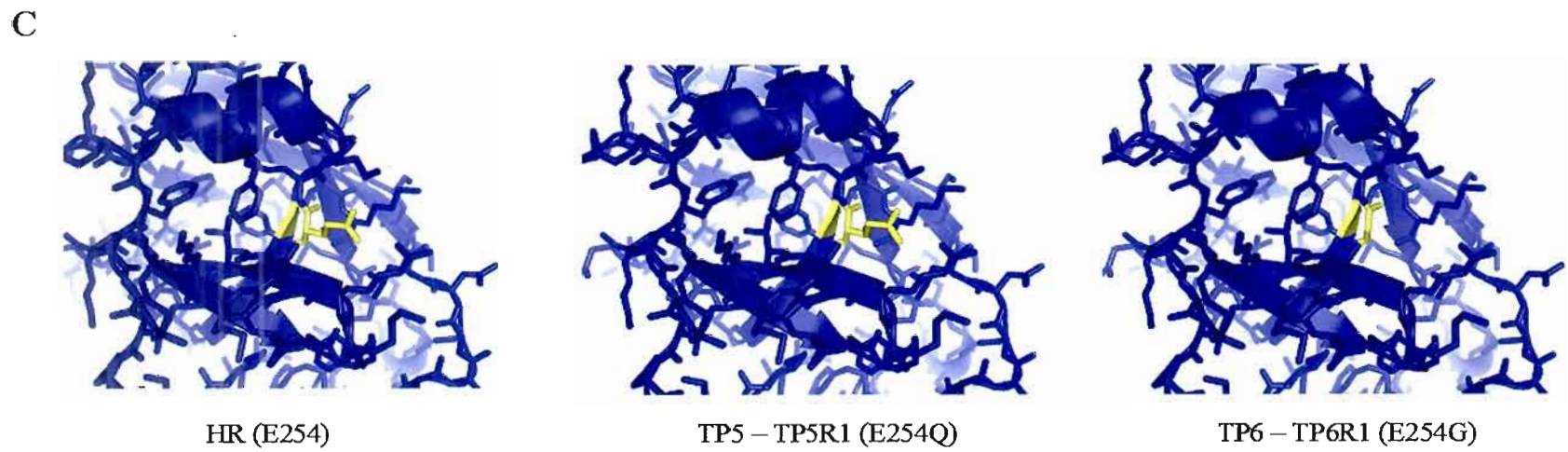
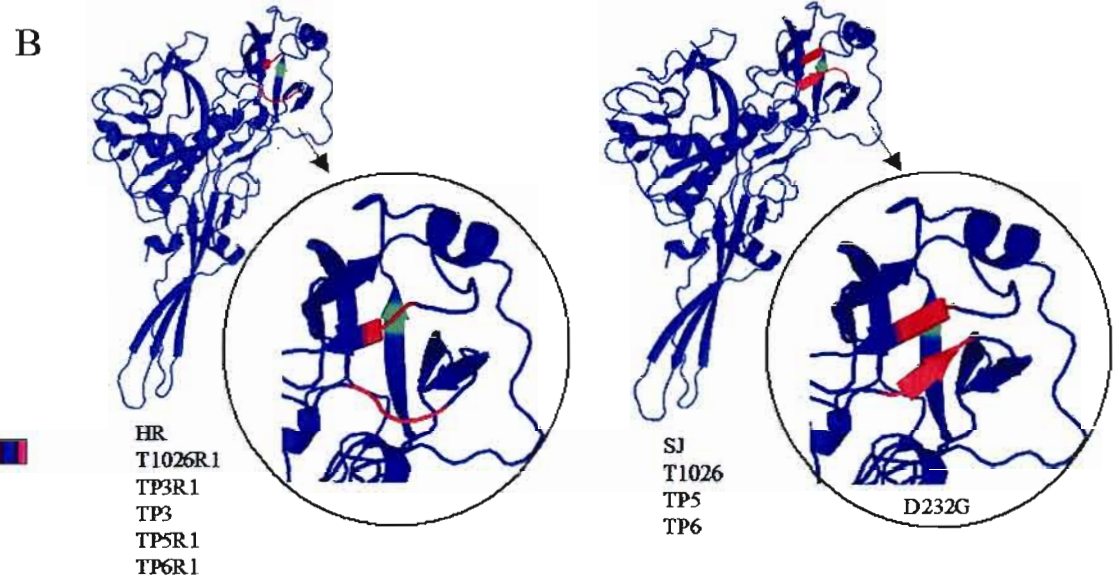
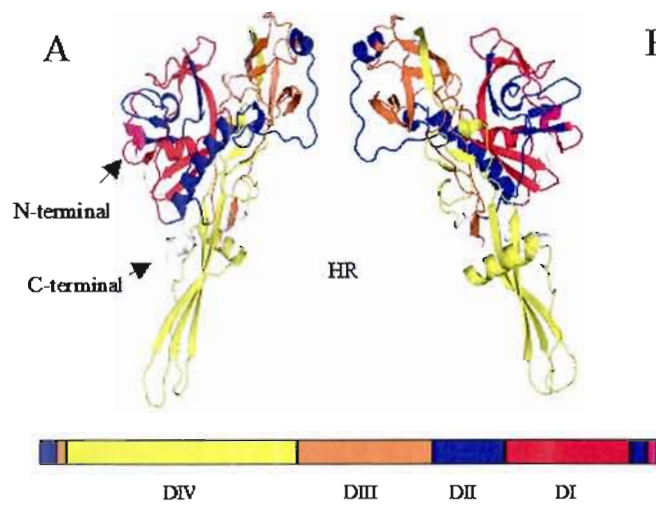
HR FIDYYAGL A367T FIDYYTGL TP3R1
 HHHHHHHH EECCCCC

HR IEWINRRISKEDR R2085G IEWINGRISKEDR TP3R1
 HHHHHHHHCCCC EEECCCCCHHHH

3.3 Prédiction des structures tertiaires de G du VSV wt HR et ses mutants thermosensibles et thermorésistants.

La cristallisation récente de la protéine G du VSV par Stéphane Roche et son équipe (Roche *et al.*, 2007) a permis de prédire l'effet des mutations trouvées sur la glycoprotéine des mutants du VSV à l'aide du programme de modélisation des protéines PYMOL. La Figure 10A présente deux faces de la protéine G cristallisée dans la « prefusion form ». Chaque domaine est identifié par sa couleur. La figure 10B présente les deux formes que peut prendre la glycoprotéine des virus étudiés. De toutes les mutations trouvées sur G, la mutation D232G est la seule à modifier sa structure. Un feuillet beta additionnel (en bas, en rouge) et l'allongement d'un autre apparaissent (la queue de la flèche rouge du haut) dans le « PH domain ». Les mutations E254Q et E254G (représentées en vert) qui sont retrouvées respectivement chez les mutants TP5R1 et TP6R1 n'affectent pas le changement de structure apporté par D232G. La figure 10C montre la modification des acides aminés qu'implique les mutations E254Q et E254G par rapport à la souche parentale HR. La protéine G portant la mutation E254Q est en tout point identique à HR, même la masse molaire l'acide glutamique et de la glutamine (72g / mole). La mutation E254G change le radical de la glutamine pour un radical de glycine qui n'est qu'un hydrogène.

Figure 10: Impact des mutations sur la structure de protéines G dans la « prefusion form » appartenant à la souche parentale HR du VSV et ses mutants. (A) Image de deux faces de la protéine G de la souche parentale HR colorée par domaine. Domaine latéral (I); Domaine de trimérisation (II); « pH domain » (III); Domaine de fusion (IV) (B) Impact de la mutation D232G sur le « pH domain ». Les conséquences de la mutation D232G paraissent en rouge. La position de l'acide aminé 254 (voir en C) paraît en vert. (C) Impact des mutations E254G sur les mutants TP5 et TP5R1 et E254G sur les mutants TP6 et TP6R1. Toutes ces figures ont été générées avec PYMOL.



3.4 Analyse de changements post-traductionnels suite à la mutation E254G de TP6 et TP6R1 et E254Q e TP5 et TP5R1 sur la protéine G.

Étant donné que G est une glycoprotéine transmembranaire synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux et exportée à la membrane, nous avons voulu vérifier si les séquences des protéines G de TP5, TP5R1, TP6 et TP6R1 ont des modifications post-traductionnelles par rapport à HR. Les outils informatiques analysant la C-mannolysation, la N-Glycosylation, les ancres GPI, la myristoylation en N-terminal, la palmitoylation et les sites de phosphorylation avec leur kinase associée ont été utilisés dans ce travail. Suite à cette analyse, aucun changement post-traductionnel n'a été enregistré.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

L'objectif de ce travail était d'identifier de nouvelles mutations capables de modifier le phénotype d'infection de mutants du VSV par rapport à la souche parentale HR. La connaissance de ces mutations avait le potentiel d'approfondir les connaissances du mécanisme d'oncolyse et ainsi de permettre des modifications génétiques à un virus pour optimiser la destruction d'un cancer donné. De plus, le choix de virus thermorésistants ainsi que leur homologue thermosensible avait pour objectif de comprendre le passage de l'un à l'autre.

Nous avons choisi de séquencer le génome entier des mutants T1026, T1026R1, TP3, TP3R1, TP5, TP5R1, TP6, TP6R1 car ces mutants ont des différences marquées au niveau du phénotype d'infection par rapport à la souche parentale HR. L'induction de l'apoptose diminue, en comparaison avec la souche parentale HR, pour les mutants T1026, T1026R1, TP3 et TP3R1 sur certaines lignées cellulaires (Desforges *et al.*, 2002). La mutation M51R dans la protéine de la matrice de T1026 et T1026R1 expliquerait en partie leur phénotype atténué. En partie, car elle ne suffit pas à reproduire le phénotype d'infection de T1026 et T1026R1 lorsqu'on change la protéine M du sauvage pour celle de T1026 et T1026R1. D'autres mutations seraient responsables de leur comportement (Kopecky *et al.*, 2001). Les mutations V221F et S226R sur M de TP3 et TP3R1 sont aussi connues, mais rien dans la littérature n'avance qu'elles sont les seules responsables de leur phénotype d'infection analogue à celui de T1026 et T1026R1. Quant à eux, les mutants TP5, TP5R1, TP6, TP6R1 causent l'apoptose plus rapidement que le VSV HR, toujours sur certaines lignées cellulaires (Desforges, 2002). Le séquençage de ces variants du VSV permettra de mieux

comprendre ce qui les distinguent de la souche parentale HR et aussi de valider leur nom de mutant.

Une des raisons qui expliquent la différence sur la vitesse d'induction de l'apoptose de tous les mutants séquencés réside, entre autre, dans le fait qu'ils provoquent l'activation du système interféron plus fortement que HR. Il est maintenant admis que l'expression de l'INF- β augmente en raison de la mutation M51R sur M. Une des conséquences de cette mutation est d'empêcher l'inhibition du transport nucléocytoplasmique via NUP98 (Petersen *et al.*, 2000) et de lever l'inhibition de l'activité transcriptionnelle par effet sur TBP (Ahmed *et al.*, 1998). En levant l'inhibition, la protéine M permet à certains ARNm cellulaires d'atteindre le cytoplasme. L'expression accrue d'INF- β serait une des conséquences de cette action de M (M51R) sur le pore (Stojdl *et al.* 2003). En révélant les mutations de la protéine M de tous les mutants, il sera possible de constater si cette hypothèse s'applique à d'autres mutants du VSV HR.

En ce qui à trait aux résultats du séquençage (figures 4 à 8), nous avons remarqué qu'à la différence du thermosensible, le mutant T1026R1 manifeste un retour au génotype de la souche San Juan avec la mutation V225I (figure 6). Cette mutation pourrait altérer l'attachement de la protéine de la matrice par son NLS qui se trouverait, d'après des études préliminaires, non-spécifiquement entre les acides aminés 47 à 229 (Petersen *et al.*, 2000). Cependant, étant donné que les phénotypes d'infection des mutants du VSV T1026 et T1026R1 à la température non-restrictive sont très semblables, cette mutation n'a probablement aucune influence. Et comme il était attendu, la mutation M51R a été trouvée sur la protéine M des mutants T1026 et T1026R1.

Les autres mutants ayant révélé des différences dans la séquence de M sont TP3 et TP3R1. Les mutations V221F et S226R ont été trouvées, tout comme les résultats précédents (Beausoleil, 1994). De la même manière que la mutation V225I de T1026R1, ces mutations non-conservatrices pourraient aussi affecter la

séquence NLS comprise entre les acides aminés 47-229 (Petersen *et al.*, 2000). Le phénotype atténué des mutants TP3 et TP3R1, comparables à celui des mutants T1026 et T1026R1, pourrait provenir de la difficulté pour la protéine M à entrer dans le noyau. À l'instar de l'association au pore nucléaire de M-Rae1 et NUP98 pour l'export, la protéine M de TP3 et TP3R1 pourrait avoir de la difficulté à s'associer directement ou indirectement à une importine. Cependant, après avoir modélisé la protéine M, aucune différence sur la structure tridimensionnelle a été vue. Finalement, des travaux sur le signal de localisation nucléaire de la protéine M ont démontrés que les mutations V221A et S226A n'affectent pas le transport de M au noyau (Glodowski *et al.* 2002).

Les mutants atténués T1026 et T1026R1 n'ont aucune mutation dans la protéine de la nucléocapside et la phosphoprotéine par rapport au VSV HR. Les protéines G et L ont quant à elles plusieurs mutations. Dans le cas de la protéine de la polymérase L, une mutation non-conservatrice sur trois a été trouvée sur le mutant T1016 alors que le thermorésistant T1026R1 n'en a aucune. Étant plus près phénotypiquement de la souche parentale HR en raison de la résistance à la chaleur, l'absence de mutation dans la séquence de L du mutant T1026R1 était envisageable. La mutation responsable de la thermosensibilité de T1026 se trouverait, selon Stanners, dans son ARN polymérase ARN dépendante (Stanners *et al.*, 1977). Après séquençage, les mutations H114Q et R296K s'avèrent les meilleures candidates pour le passage au phénotype thermosensible si l'on suit la proposition de Stanners. Cependant, étant non-conservatrice et du fait que R296K n'affecte pas la structure secondaire, la mutation H114Q serait à favoriser.

La protéine L est une excellente candidate pour expliquer le passage à la thermosensibilité, car à elle seule, elle couvre plus de la moitié du génome du VSV. Cependant, l'idée de lui accorder la responsabilité du passage à la thermosensibilité a été remise en question suite à l'absence de mutation dans TP3, TP5 et TP6. Peu d'études ont été menées sur L, mais il est connu que la région essentielle à l'activité méthyltransférase (MTase) de la protéine L est située entre

les acides aminés 1419-1672 (Grdzlishvili *et al.*, 2005 ; Grdzlishvili *et al.*, 2006). De toutes les mutations identifiées dans ce projet, aucune ne se trouve dans cette région. Son rôle est d'ajouter un groupement méthyl au guanosine-N7 et à l'adénosine-2'-O situés en 5' de l'ARNm. Les mutants séquencés dans ce travail n'ont pas de mutations qui pourraient altérer d'une quelconque manière la méthylation des ARNm. La mutation responsable de la thermosensibilité pourrait être différente d'un mutant à l'autre, mais les mutations H114Q de T1026 et A367T du Indiana San Juan sur L laissent supposer que la région entre les acides aminés 100 et 400 pourrait jouer un rôle majeur dans la fonction de la polymérase. La mutation conservatrice A826V pourrait également être impliquée dans la thermosensibilité de T1026.

Les protéines N et P ont été conservées chez tous les mutants sauf TP3R1. Les mutations R155K et S353N qui marquent un retour au virus sauvage Indiana San Juan ont été identifiées sur sa protéine de la nucléocapside. Ces mutations n'affectent pas la structure de la protéine d'après l'analyse avec PYMOL. En ce qui a trait à la protéine P, la mutation S189Y dans le domaine C-terminal (Ding *et al.*, 2004) implique la substitution du groupement hydroxyle de la sérine pour un phénol. La structure secondaire se trouve faiblement altérée et une modification de la structure tertiaire pourrait être envisagée en raison du changement significatif dans la taille des radicaux. L'analyse des structures tridimensionnelles de P grâce aux bases de données actuelles n'ont pas permis de mesurer l'effet de la mutation sur la structure, car seul le segment incluant les acides aminés 107 à 177 pouvait être visualisé.

En considérant qu'un des rôles du domaine C-terminal de la protéine P est d'attacher les protéines N et L au complexe de réplication (Das et Pattnaik, 2005) et en admettant que la mutation S189Y du mutant TP3R1 puisse affecter la structure, il serait possible que cette mutation affecte son phénotype d'infection. Il faut ajouter que la sérine à la position 189 n'est pas un site de phosphorylation essentiel au fonctionnement de la protéine. Comme il a été mentionné dans l'état

des connaissances, ce sont les résidus Ser60, Thr62 et Ser64 qui sont indispensables à l'activité transcriptionnelle de P (Chen *et al.*, 1997). Et même si c'était le cas, la mutation S189Y permettrait tout de même la phosphorylation, mais impliquerait différentes kinases.

La protéine G a été la plus touchée par les mutations. Entre autres, il est intéressant de constater que les mutants atténués (sauf TP3) gagnent chacun deux histidines soit R242H et Y487H pour T1026 et T1026R1 et Y24H et R242H pour TP3R1. Les histidines sont essentielles à l'étape de la fusion. L'acidité augmentant, les histidines sur G deviennent chargées positivement par la protonation en milieu acide. Il a été démontré que l'ajout de diétyl pyrocarbonate (DEPC) empêche la protonation des histidines ce qui bloque la fusion. Cependant, les histidines à la position 148 et 149 seraient les résidues actifs putatifs (Carnero *et al.* 2003). Il serait tout de même possible que l'ajout de deux charges positives après protonation dans l'endosome puisse avoir un effet sur la fusion. Finalement, les mutants T1026R1 et TP3R1 partagent la mutation Q26R sur G. Cette mutation non-conservatrice ne se situe pas dans un domaine fonctionnel identifié de la protéine et n'affecte pas la structure secondaire ni tertiaire.

Plusieurs travaux ont été publiés sur les mutants de notre laboratoire T1026 et TP3 qui suscitent de l'intérêt par leur phénotype d'infection atténuée, mais récemment une attention particulière a été portée aux les mutants TP5, TP5R1, TP6 et TP6R1. La ou les mutations responsable(s) de l'induction rapide de l'apoptose étaient attendue(s) dans la protéine M en raison de son implication majeure dans cette étape. Nous avons été étonnés de constater que la glycoprotéine était la seule protéine sur laquelle des mutations sont apparues. Les mutations qui caractérisent TP5R1 et TP6R1 se trouvent dans le « Pleckstrin homology domain (PH domain)» qui est contenu entre les acides aminés 36 à 46 et 181 à 258, d'après la protéine G cristallographiée dans la « prefusion form » (Roche *et al.*, 2007). Le phénotype de TP5, TP5R1 TP6 et TP6R1 étant apparenté, il n'était pas curieux de retrouver le même acide aminé muté soit l'acide

glutamique 254. En considérant la modification du radical qu'implique les mutations E254Q de TP5 et TP5R1 et E254G de TP6 et TP6R1, la mutation E254G semblait beaucoup plus importante. Cette hypothèse a été renforcée suite à l'analyse des effets sur la structure 2D. En effet, malgré la présence de la mutation E254Q il n'existe pas de différence entre les mutants TP5R1, TP5 et la souche parentale HR. Cependant, la visualisation des structures 3D des mutants TP5R1, TP5, TP6R1 et TP6 ne présentent aucune différence par rapport à HR.

Le « PH domain » est un domaine de liaison d'environ 100 acides aminés qui s'attache aux phosphoinositols phosphorylés (ou phosphoinositides). Parmi, au moins, dix variétés de domaines se liant aux phospholipides, le « PH domain » est retrouvé en majeure proportion dans de nombreux animaux dont l'homme. Un exemple de protéine possédant un « PH domain » est la dynamine, un moteur moléculaire associé aux clathrines et hydrolysant le GTP qui induit la scission des endosomes afin qu'ils soient relargués dans le cytoplasme (Lemmon, 2008).

Dans le cas du VSV, le « PH domain » de la protéine G aide le virus à s'attacher à la membrane plasmique. Cependant, durant une infection, le VSV doit s'attacher à deux reprises à la membrane plasmique. La première est lors de l'entrée en contact du virus à la cellule et l'autre est à l'intérieur de l'endosome. Le pouvoir des mutants TP5, TP5R1, TP6 et TP6R1 d'induire l'apoptose rapidement aurait pu venir du fait que leur mutation favorise l'attachement des virus à la cellule ou augmente la vitesse de fusion à la membrane de l'endosome. Les mutations E254Q de TP5 et TP5R1 et E254G de TP6 et TP6R1 auraient pu pousser la glycoprotéine à entrer plus tôt dans sa forme activée hydrophobe, essentielle à la fusion. En effet, il aurait été possible qu'elle amorce la fusion à un pH supérieur que celui du virus sauvage donc plus tôt. Cependant, il s'avère que l'analyse des structures tridimensionnelles des glycoprotéines G mutées démontre qu'il y a aucun changement de structure par rapport à la protéine G de la souche parentale ce qui nous amène à réévaluer cette hypothèse. On ne peut tout de même pas exclure tout à fait la possibilité que la perte de la charge négative et/ou le

changement de volume du radical, dans une région accessible à la surface de la protéine, puisse modifier des interactions importantes.

Un des désavantages majeurs de la virothérapie oncolytique tient de la séropositivité que développe les patients pour le virus après une première infection. Il serait concevable d'y remédier en utilisant plusieurs virus ou seulement en modifiant la ou les protéines antigéniques. Il s'avère que les mutations E254G et E254Q tombent sur la région de la protéine qui habite le site antigénique majeur des rhabdovirus soit le « PH domain » (Vandepol *et al.*, 1986 ; Roche *et al.*, 2007). En considérant que les sites antigéniques de TP5 et TP5R1, visibles à la Figure 10, sont semblables à celui de HR, cette possibilité a aussi été rejetée. Dans le cas de TP6 et TP6R1, il serait étonnant que seule la modification d'un acide aminé qui n'affecte pas la structure 3D suffise à altérer le site antigénique, mais cela demeure possible. Par contre, la mutation D232G qui modifie la structure de la protéine G pourrait y arriver. Devant cette observation, il serait intéressant de comparer l'affinité d'anticorps anti-G de VSV thermorésistant par rapport aux anticorps anti-G de VSV thermosensibles.

En supposant que les mutations de TP5, TP5R1, TP6 et TP6R1 altèrent l'ensemble de la structure de la glycoprotéine, il était possible d'imaginer des conséquences autres que l'attachement à la membrane de la cellule hôte ou la fusion avec l'endosome. Partant du fait que le rôle de la protéine G dans le VSV est également d'apporter une aide au bourgeonnement (Robison et Whitt, 2000), les mutations pouvaient favoriser cette étape. Les titres viraux étant plus grand dans le temps que la souche parentale HR, l'induction de l'apoptose par ces mutants pouvait ainsi être favorisée. Cependant, devant l'absence de différence sur la structure 3D des glycoprotéines de ces mutants, encore une fois cette hypothèse n'a pu être retenue. Par ailleurs, récemment notre laboratoire a testé cette possibilité et il s'est avéré que les titres viraux des mutants TP5, TP5R1, TP6 et TP6R1 ne sont pas supérieurs à HR ni aux autres mutants dans le temps (Janelle *et al.*, sous presse).

Il existe un faible nombre de mutation dans la glycoprotéine de virus qui confèrent un avantage sur la vitesse d'induction d'apoptose. Ce sont plutôt des effets nuisibles sur l'infection qui surviennent. Cependant, l'augmentation de la fusion de cellule à cellule est une conséquence qui peut accélérer l'infection. C'est le cas du virus de la rougeole appartenant à la famille des Paramyxovirus. La mutation Y549A dans le domaine cytoplasmique de sa protéine de fusion F augmente la formation de synticia (Runkler *et al.*, 2008). La fusion de cellule à cellule est également fortement amplifiée dans le cas du virus Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) lorsque le domaine cytoplasmique de sa glycoprotéine porte les mutations T4A, K7A, Q9A, and I10A (Song *et al.*, 2005). Un autre exemple provient du virus HSV avec ses mutations dans la portion cytoplasmique de sa protéine gB (Ruel *et al.*, 2005).

Il s'avère que le domaine cytoplasmique d'une glycoprotéine intramembranaire est très souvent le principal concerné dans l'augmentation de la fusion de cellule à cellule. Cependant même en supposant que les mutations E254G et E254Q dans l'ectodomaine altèrent la structure du domaine cytoplasmique de G du VSV, aucun changement ne devrait apparaître. En effet, pour remplir ses fonctions, la queue cytoplasmique de G peut être modifiée dans sa taille et sa composition de manière à ce qu'il n'y ait aucune conséquence sur l'infection. Il a été établi que le minimum d'acides aminés requis pour permettre à G de fonctionner normalement est d'avoir une longueur de neuf acides aminés (mutant CT9). Le mutant du VSV CT1 n'a, quant à lui, qu'un seul acide aminé sur la portion cytoplasmique de sa protéine G et son titre est 10% celui du sauvage (Schnell *et al.*, 1998).

La résistance et la sensibilité à la chaleur de nos mutants du VSV seraient dues à une mutation sur la protéine G et non sur la protéine L. L'hypothèse selon laquelle la protéine de la polymérase et celles qui la régulent seraient responsables de ce phénotype avaient été supposée étant donné que nous savions qu'il existait des mutants ayant acquis la thermosensibilité par une mutation dans cette dernière

(Hunt et Hutchinson, 1993). De plus, la régulation de la transcription et de la réplication est souvent le mécanisme par lequel ce phénotype survient. C'est le cas du virus respiratoire syncytial (RSV) appartenant à l'ordre des Mononégavirale (comme le VSV) et dans la famille des Paramyxovirus. La souche du RSV ayant une mutation G172S sur sa phosphoprotéine a acquis sa thermosensibilité par son incapacité à transcrire et répliquer son génome (Marriott *et al.*, 1999). Un autre exemple de thermosensibilité causée par l'altération de la transcription est le cas du virus du sarcome murin Moloney (MoMSV). Une mutation dans le site signal pour l'épissage en 5' était responsable du phénotype thermosensible (Ainsworth *et al.*, 1996).

Ici, la mutation D232G dans la glycoprotéine du VSV, située dans le « PH domain », apparaît sur tous les virus thermosensibles (sauf TP3) y compris le virus sauvage Indiana San Juan. Cette disposition la place en haut de la liste des mutations possibles pouvant conférer la thermosensibilité. De plus, elle modifie la structure tridimensionnelle de la protéine G ce qui renforce l'idée qu'elle pourrait être responsable de ce phénotype. Ces résultats suggèrent l'idée que HR, qui est dérivé du virus Indiana San Juan, aurait acquis son phénotype de résistance à la chaleur suite à la mutation G232D. Par contre, le problème de cette hypothèse se pose lorsqu'on s'arrête sur le cas du mutant thermosensible TP3 qui ne porte pas cette mutation. Le phénotype thermosensible de ce mutant qui n'a aucune mutation mis à part celle sur sa protéine M est difficile à comprendre. Malgré une analyse rigoureuse des séquences des VSV considérées dans ce projet, une ou plusieurs mutations a pu nous passer sous le nez. Il est également possible que le mutant TP3 ait perdu sa thermosensibilité à force de passage avec les années. Pour confirmer la responsabilité de la mutation D232G dans la thermosensibilité, les protéines G d'autres VSV thermosensibles devront être séquencées.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Après le séquençage et l'analyse de l'impact des mutations, nous avons constaté que les seules mutations portées par TP5, TP5R1, TP6 et TP6R1 se retrouvent dans la glycoprotéine. Les mutations E254Q de TP5R1 et E254G de TP6R1 se trouvent dans le « PH domain » qui sert à l'attachement à la membrane. L'analyse de la structure secondaire présente des différences avec le VSV HR pour les mutants TP6R1 et TP6 alors qu'aucun changement de la structure tertiaire n'a été observé. Nous avons tenté de voir si cela pouvait modifier le remaniement post-traductionnel avec des outils d'analyse de protéine (EXPASY) et ces mutations n'ont aucun effet. Après avoir analysé chacune des étapes accomplies par G, les mutations pourraient augmenter la fusion de cellule à cellule durant l'infection. Finalement, il est possible de croire qu'une protéine cellulaire inconnue interagisse près de l'acide aminé 254, c'est à dire avec le « PH domain », lors de l'attachement de G à la membrane ou lors de la fusion avec l'endosome. D'ailleurs, la modification de l'attachement d'une protéine cellulaire à G est compatible avec une absence de modification de la structure 3D.

Comme il était attendu, les mutations des souches de VSV atténués T1026, T1026R1, TP3 et TP3R1 dans la protéine M ont été trouvées. T1026 et T1026R1 n'ont pas de mutation dans les protéines N et P alors que G et L sont touchées. TP3 n'a aucune mutation, outre celles attendues dans M, alors que son homologue thermorésistant TP3R1 est celui où le plus grand nombre de mutations ont été trouvées.

Considérant le rôle de certaines histidines composant la glycoprotéine dans l'étape de la fusion, nous avons été attentifs à l'ajout de deux histidines supplémentaires amenées par les mutations R242H et Y487H de T1026 et T1026R1 et Y24H et R242H de TP3R1. La mutation S189Y a été trouvée sur la phosphoprotéine de TP3R1. Agissant de concert avec la polymérase L, cette

mutation pourrait participer au phénotype atténué du mutant en altérant la transcription et la réplication.

La protéine L n'est mutée que chez les mutants T1026 et TP3R1. Le mutant TP3R1 porte trois mutations sur L qui marquent un retour au génotype du VSV Indiana San Juan. Étant donné que la littérature prévoyait que le passage de la thermorésistance à la thermosensibilité était dû à une mutation dans cette dernière, nous en attendions quelques-unes. Effectivement, deux mutations conservatrices ont été trouvées et une non-conservatrice soit H114Q. Cette mutation pourrait être responsable du passage à la thermosensibilité de T1026.

Suite à l'analyse de chacune des mutations trouvées, D232G est présente chez tous les thermosensibles (excepté TP3) y compris le VSV Indiana San Juan. De plus, cette mutation qui est située dans le « PH domain » modifie la structure tertiaire de la glycoprotéine. À la différence de ce que la littérature annonçait, la protéine G pourrait être à l'origine de ce phénotype. Il est possible que le passage du VSV Indiana San Juan au VSV Indiana San Juan HR soit dû à la mutation G232D.

Évidemment, le séquençage des virus oncolytiques de cette recherche ne fait qu'ouvrir la voie à une explication de leur phénotype d'infection particulier. Pour confirmer l'impact des mutations sur l'infection, la mutagenèse dirigée devra être entreprise sur le VSV HR. De plus, l'affinité des anticorps pour la protéine G des virus thermorésistants par rapport à celle des virus thermosensibles devra être analysée vu le changement de structure apporté par D232G sur le domaine antigénique. Le cas échéant, il serait possible de surmonter la séropositivité d'une première infection dans le contexte de la virothérapie oncolytique.

RÉFÉRENCES

Aghi, M., and Martuza, R. L. (2005). Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene* 24, 7802-7816.

Ahmed, M., and Lyles, D. S. (1998). Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on transcription directed by host RNA polymerases I, II, and III. *Journal of virology* 72, 8413-8419.

Ainsworth, J. R., Rossi, L. M., and Murphy, E. C., Jr. (1996). The Moloney murine sarcoma virus ts110 5' splice site signal contributes to the regulation of splicing efficiency and thermosensitivity. *Journal of virology* 70, 6474-6478.

Akporiaye, E. T., and Hersh, E. (1999). Clinical aspects of intratumoral gene therapy. *Curr Opin Mol Ther* 1, 443-453.

Aleman, B. M., van den Belt-Dusebout, A. W., Klokman, W. J., Van't Veer, M. B., Bartelink, H., and van Leeuwen, F. E. (2003). Long-term cause-specific mortality of patients treated for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 21, 3431-3439.

Allan, J. M., and Travis, L. B. (2005). Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 5, 943-955.

American Cancer Society (2006). *Cancer facts and figures 2006*. Atlanta: American Cancer Society.

Barr, J. N., Whelan, S. P., and Wertz, G. W. (2002). Transcriptional control of the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Biochimica et biophysica acta* 1577, 337-353.

Battcock, S. M., Collier, T. W., Zu, D., and Hirasawa, K. (2006). Negative regulation of the alpha interferon-induced antiviral response by the Ras/Raf/MEK pathway. *Journal of virology* 80, 4422-4430.

Beausoleil, S. 1994. Protéine M de mutants P- du virus de la stomatite vésiculeuse: modifications génétiques et effets sur la synthèse protéique. Mémoire M. Sc.. UQAM.

Bergman, I., Whitaker-Dowling, P., Gao, Y., Griffin, J. A., and Watkins, S. C. (2003). Vesicular stomatitis virus expressing a chimeric Sindbis glycoprotein containing an Fc antibody binding domain targets to Her2/neu overexpressing breast cancer cells. *Virology* 316, 337-347.

Breckpot, K., Heirman, C., Neyns, B., and Thielemans, K. (2004). Exploiting dendritic cells for cancer immunotherapy: genetic modification of dendritic cells. *J Gene Med* 6, 1175-1188.

Carneiro, F. A., Stauffer, F., Lima, C. S., Juliano, M. A., Juliano, L., and Da Poian, A. T. (2003). Membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus depends on histidine protonation. *The Journal of biological chemistry* 278, 13789-13794.

Carr, C. M., and Kim, P. S. (1993). A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell* 73, 823-832.

Cascallo, M., Capella, G., Mazo, A., and Alemany, R. (2003). Ras-dependent oncolysis with an adenovirus VAI mutant. *Cancer Res* 63, 5544-5550.

Cavallo, F., Signorelli, P., Giovarelli, M., Musiani, P., Modesti, A., Brunda, M. J., Colombo, M. P., and Forni, G. (1997). Antitumor efficacy of adenocarcinoma cells engineered to produce interleukin 12 (IL-12) or other cytokines compared with exogenous IL-12. *Journal of the National Cancer Institute* 89, 1049-1058.

Chen, J. L., Das, T., and Banerjee, A. K. (1997). Phosphorylated states of vesicular stomatitis virus P protein in vitro and in vivo. *Virology* 228, 200-212.

Chung, R. Y., Saeki, Y., and Chiocca, E. A. (1999). B-myb promoter retargeting of herpes simplex virus gamma34.5 gene-mediated virulence toward tumor and cycling cells. *Journal of virology* 73, 7556-7564.

Clague, M. J., Schoch, C., Zech, L., and Blumenthal, R. (1990). Gating kinetics of pH-activated membrane fusion of vesicular stomatitis virus with cells: stopped-flow measurements by dequenching of octadecylrhodamine fluorescence. *Biochemistry* 29, 1303-1308.

Coil, D. A., and Miller, A. D. (2004). Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *Journal of virology* 78, 10920-10926.

Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deleage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends in biochemical sciences* 25, 147-150.

Connor, J. H., and Lyles, D. S. (2002). Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *Journal of virology* 76, 10177-10187.

Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*, Second Edition. Sinauer Associates, Inc.

Das, S. C., and Pattnaik, A. K. (2005). Role of the hypervariable hinge region of phosphoprotein P of vesicular stomatitis virus in viral RNA synthesis and assembly of infectious virus particles. *Journal of virology* 79, 8101-8112.

Davis, J. J., and Fang, B. (2005). Oncolytic virotherapy for cancer treatment: challenges and solutions. *J Gene Med* 7, 1380-1389.

Davis, J. J., Wang, L., Dong, F., Zhang, L., Guo, W., Teraishi, F., Xu, K., Ji, L., and Fang, B. (2006). Oncolysis and suppression of tumor growth by a GFP-expressing oncolytic adenovirus controlled by an hTERT and CMV hybrid promoter. *Cancer Gene Ther* 13, 720-723.

De Flora, S., and Ferguson, L. R. (2005). Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat Res* 591, 8-15.

Desforges, M., Despars, G., Berard, S., Gosselin, M., McKenzie, M. O., Lyles, D. S., Talbot, P. J., and Poliquin, L. (2002). Matrix protein mutations contribute to inefficient induction of apoptosis leading to persistent infection of human neural cells by vesicular stomatitis virus. *Virology* 295, 63-73.

DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. (1997). A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388, 548-554.

Ding, H., Green, T. J., and Luo, M. (2004). Crystallization and preliminary X-ray analysis of a proteinase-K-resistant domain within the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus (Indiana). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2087-2090.

Durrer, P., Gaudin, Y., Ruigrok, R. W., Graf, R., and Brunner, J. (1995). Photolabeling identifies a putative fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies and vesicular stomatitis viruses. *The Journal of biological chemistry* 270, 17575-17581.

Emerson, S. U., and Wagner, R. R. (1972). Dissociation and reconstitution of the transcriptase and template activities of vesicular stomatitis B and T virions. *Journal of virology* 10, 297-309.

Farassati, F., Yang, A. D., and Lee, P. W. (2001). Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1. *Nat Cell Biol* 3, 745-750.

Faria, P. A., Chakraborty, P., Levay, A., Barber, G. N., Ezelle, H. J., Enninga, J., Arana, C., van Deursen, J., and Fontoura, B. M. (2005). VSV disrupts the Rael/mrnp41 mRNA nuclear export pathway. *Molecular cell* 17, 93-102.

Fechner, H., Wang, X., Srouf, M., Siemietzki, U., Seltmann, H., Sutter, A. P., Scherubl, H., Zouboulis, C. C., Schwaab, R., Hillen, W., *et al.* (2003). A novel tetracycline-controlled transactivator-transrepressor system enables external control of oncolytic adenovirus replication. *Gene Ther* 10, 1680-1690.

Fernandez, M., Porosnicu, M., Markovic, D., and Barber, G. N. (2002). Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease. *Journal of virology* 76, 895-904.

Flanagan, E. B., Zamparo, J. M., Ball, L. A., Rodriguez, L. L., and Wertz, G. W. (2001). Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development. *Journal of virology* 75, 6107-6114.

Flowers, C. C., Woffendin, C., Petryniak, J., Yang, S., and Nabel, G. J. (1997). Inhibition of recombinant human immunodeficiency virus type 1 replication by a site-specific recombinase. *Journal of virology* 71, 2685-2692.

Francoeur, A. A. M., Poliquin, L. L., and Stanners, C. C. P. (1987). The isolation of interferon-inducing mutants of vesicular stomatitis virus with altered viral P function for the inhibition of total protein synthesis. *Virology* 160, 236-245.

Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P. S., McDonnell, T. J., Mitlianga, P., Shi, Y. X., Levin, V. A., Yung, W. K., and Kyritsis, A. P. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 19, 2-12.

Fujiwara, T., Urata, Y., and Tanaka, N. (2007). Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer with the hTERT promoter. *Curr Cancer Drug Targets* 7, 191-201.

Gao, J. Q., Sugita, T., Kanagawa, N., Iida, K., Eto, Y., Motomura, Y., Mizuguchi, H., Tsutsumi, Y., Hayakawa, T., Mayumi, T., and Nakagawa, S. (2005). A single intratumoral injection of a fiber-mutant adenoviral vector encoding interleukin 12 induces remarkable anti-tumor and anti-metastatic activity in mice with Meth-A fibrosarcoma. *Biochemical and biophysical research communications* 328, 1043-1050.

Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol* 120, 97-120.

Garnier, J., Gibrat, J. F., and Robson, B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods in enzymology* 266, 540-553.

- Gaudier, M., Gaudin, Y., and Knossow, M. (2002). Crystal structure of vesicular stomatitis virus matrix protein. *The EMBO journal* 21, 2886-2892.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Flamand, A., and Ruigrok, R. W. (1995). Biological function of the low-pH, fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation. *Journal of virology* 69, 5528-5534.
- Gilbert, E. S., Stovall, M., Gospodarowicz, M., Van Leeuwen, F. E., Andersson, M., Glimelius, B., Joensuu, T., Lynch, C. F., Curtis, R. E., Holowaty, E., *et al.* (2003). Lung cancer after treatment for Hodgkin's disease: focus on radiation effects. *Radiat Res* 159, 161-173.
- Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of biochemistry* 68, 913-963.
- Glodowski, D. R., Petersen, J. M., and Dahlberg, J. E. (2002). Complex nuclear localization signals in the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *The Journal of biological chemistry* 277, 46864-46870.
- Grdzlishvili, V. Z., Smallwood, S., Tower, D., Hall, R. L., Hunt, D. M., and Moyer, S. A. (2005). A single amino acid change in the L-polymerase protein of vesicular stomatitis virus completely abolishes viral mRNA cap methylation. *Journal of virology* 79, 7327-7337.
- Grdzlishvili, V. Z., Smallwood, S., Tower, D., Hall, R. L., Hunt, D. M., and Moyer, S. A. (2006). Identification of a new region in the vesicular stomatitis virus L polymerase protein which is essential for mRNA cap methylation. *Virology* 350, 394-405.
- Green, T. J., Macpherson, S., Qiu, S., Lebowitz, J., Wertz, G. W., and Luo, M. (2000). Study of the assembly of vesicular stomatitis virus N protein: role of the P protein. *Journal of virology* 74, 9515-9524.
- Green, T. J., Zhang, X., Wertz, G. W., and Luo, M. (2006). Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* 313, 357-360.
- Hardgrave, K. L., Neas, B. R., Scofield, R. H., and Harley, J. B. (1993). Antibodies to vesicular stomatitis virus proteins in patients with systemic lupus erythematosus and in normal subjects. *Arthritis Rheum* 36, 962-970.
- Harty, R. N., Paragas, J., Sudol, M., and Palese, P. (1999). A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding. *Journal of virology* 73, 2921-2929.

Heiser, A., Coleman, D., Dannull, J., Yancey, D., Maurice, M. A., Lallas, C. D., Dahm, P., Niedzwiecki, D., Gilboa, E., and Vieweg, J. (2002). Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 109, 409-417.

Hunt, D. M., and Hutchinson, K. L. (1993). Amino acid changes in the L polymerase protein of vesicular stomatitis virus which confer aberrant polyadenylation and temperature-sensitive phenotypes. *Virology* 193, 786-793.

Huprikar, J., Rabinowitz, S. G., DalCanto, M. C., and Rundell, M. K. (1986). Persistent infection of a temperature-sensitive G31 vesicular stomatitis virus mutant in neural and nonneural cells: biological and virological characteristics. *Journal of virology* 58, 493-499.

Janelle, V., Brassard, F., Roy, A., Lamarre, A., Poliquin, L. (2008). Effet *in vitro* de souches mutantes du virus de la stomatite vésiculeuse sur le métabolisme cellulaire en relation avec l'expression des effets cytopathiques rattachés à l'infection. Sous presse.

Jayakar, H. R., Jeetendra, E., and Whitt, M. A. (2004). Rhabdovirus assembly and budding. *Virus Res* 106, 117-132.

Knutson, K. L., and Disis, M. L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 54, 721-728.

Ko, D., Hawkins, L., and Yu, D. C. (2005). Development of transcriptionally regulated oncolytic adenoviruses. *Oncogene* 24, 7763-7774.

Kopecky, S. A., Willingham, M. C., and Lyles, D. S. (2001). Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. *Journal of virology* 75, 12169-12181.

Kurilla, M. G., and Keene, J. D. (1983). The leader RNA of vesicular stomatitis virus is bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell* 34, 837-845.

Lawson, N. D., Stillman, E. A., Whitt, M. A., and Rose, J. K. (1995). Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4477-4481.

Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature reviews* 9, 99-111.

Letchworth, G. J., Rodriguez, L. L., and Del carrera, J. (1999). Vesicular stomatitis. *Vet J* 157, 239-260.

Liu, B. L., Robinson, M., Han, Z. Q., Branston, R. H., English, C., Reay, P., McGrath, Y., Thomas, S. K., Thornton, M., Bullock, P., *et al.* (2003). ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther* 10, 292-303.

Logg, C. R., Logg, A., Matusik, R. J., Bochner, B. H., and Kasahara, N. (2002). Tissue-specific transcriptional targeting of a replication-competent retroviral vector. *Journal of virology* 76, 12783-12791.

Lun, X., Senger, D. L., Alain, T., Oprea, A., Parato, K., Stojdl, D., Lichty, B., Power, A., Johnston, R. N., Hamilton, M., *et al.* (2006). Effects of intravenously administered recombinant vesicular stomatitis virus (VSV(deltaM51)) on multifocal and invasive gliomas. *J Natl Cancer Inst* 98, 1546-1557.

Lyles, D. S. (2000). Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 709-724.

Lyles, D. S., McKenzie, M. O., Kaptur, P. E., Grant, K. W., and Jerome, W. G. (1996). Complementation of M gene mutants of vesicular stomatitis virus by plasmid-derived M protein converts spherical extracellular particles into native bullet shapes. *Virology* 217, 76-87.

Lyles, D. S., Puddington, L., and McCreedy, B. J., Jr. (1988). Vesicular stomatitis virus M protein in the nuclei of infected cells. *Journal of virology* 62, 4387-4392.

Marriott, A. C., Wilson, S. D., Randhawa, J. S., and Easton, A. J. (1999). A single amino acid substitution in the phosphoprotein of respiratory syncytial virus confers thermosensitivity in a reconstituted RNA polymerase system. *Journal of virology* 73, 5162-5165.

Mazzolini, G., Prieto, J., and Melero, I. (2003). Gene therapy of cancer with interleukin-12. *Curr Pharm Des* 9, 1981-1991.

McCreedy, B. J., Jr., and Lyles, D. S. (1989). Distribution of M protein and nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus in infected cell plasma membranes. *Virus Res* 14, 189-205.

McCormick, F. (2003). Cancer-specific viruses and the development of ONYX-015. *Cancer biology & therapy* 2, S157-160.

McKnight, J. A. (2003). Principles of chemotherapy. *Clin Tech Small Anim Pract* 18, 67-72.

Michalek, J., Buchler, T., and Hajek, R. (2004). T lymphocyte therapy of cancer. *Physiol Res* 53, 463-469.

- Mohanti, B. K., and Bansal, M. (2005). Late sequelae of radiotherapy in adults. *Support Care Cancer* 13, 775-780.
- Mulvihill, S., Warren, R., Venook, A., Adler, A., Randlev, B., Heise, C., and Kirn, D. (2001). Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial. *Gene Ther* 8, 308-315.
- Obuchi, M., Fernandez, M., and Barber, G. N. (2003). Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *Journal of virology* 77, 8843-8856.
- Ogino, T., and Banerjee, A. K. (2007). Unconventional mechanism of mRNA capping by the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Molecular cell* 25, 85-97.
- Ogino, T., and Banerjee, A. K. (2008). Formation of guanosine(5')tetraphospho(5')adenosine (GppppA) cap structure by an unconventional mRNA capping enzyme of vesicular stomatitis virus. *Journal of virology*.
- Paul, P. R., Chattopadhyay, D., and Banerjee, A. K. (1988). The functional domains of the phosphoprotein (NS) of vesicular stomatitis virus (Indiana serotype). *Virology* 166, 350-357.
- Petersen, J. M., Her, L. S., Varvel, V., Lund, E., and Dahlberg, J. E. (2000). The matrix protein of vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes. *Mol Cell Biol* 20, 8590-8601.
- Poch, O., Blumberg, B. M., Bougueleret, L., and Tordo, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *The Journal of general virology* 71 (Pt 5), 1153-1162.
- Pornillos, O., Garrus, J. E., and Sundquist, W. I. (2002). Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol* 12, 569-579.
- Porter, A., Aref, A., Choudounsky, Z., Elzawawy, A., Manatrakul, N., Ngoma, T., Orton, C., Van't Hooft, E., and Sikora, K. (1999). A global strategy for radiotherapy: a WHO consultation. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 11, 368-370.
- Raper, S. E., Yudkoff, M., Chirmule, N., Gao, G. P., Nunes, F., Haskal, Z. J., Furth, E. E., Propert, K. J., Robinson, M. B., Magosin, S., *et al.* (2002). A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Gene Ther* 13, 163-175.

Roberts, A., Buonocore, L., Price, R., Forman, J., and Rose, J. K. (1999). Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *Journal of virology* 73, 3723-3732.

Roberts, A., Kretzschmar, E., Perkins, A. S., Forman, J., Price, R., Buonocore, L., Kawaoka, Y., and Rose, J. K. (1998). Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an influenza virus hemagglutinin provides complete protection from influenza virus challenge. *Journal of virology* 72, 4704-4711.

Robison, C. S., and Whitt, M. A. (2000). The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly. *Journal of virology* 74, 2239-2246.

Roche, S., and Gaudin, Y. (2002). Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers. *Virology* 297, 128-135.

Roche, S., Rey, F. A., Gaudin, Y., and Bressanelli, S. (2007). Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* 315, 843-848.

Rodriguez, L. L., Pauszek, S. J., Bunch, T. A., and Schumann, K. R. (2002). Full-length genome analysis of natural isolates of vesicular stomatitis virus (Indiana 1 serotype) from North, Central and South America. *The Journal of general virology* 83, 2475-2483.

Rolls, M. M., Webster, P., Balba, N. H., and Rose, J. K. (1994). Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA. *Cell* 79, 497-506.

Ruel, N., Zago, A., and Spear, P. G. (2006). Alanine substitution of conserved residues in the cytoplasmic tail of herpes simplex virus gB can enhance or abolish cell fusion activity and viral entry. *Virology* 346, 229-237.

Runkler, N., Dietzel, E., Moll, M., Klenk, H. D., and Maisner, A. (2008). Glycoprotein targeting signals influence the distribution of measles virus envelope proteins and virus spread in lymphocytes. *The Journal of general virology* 89, 687-696.

Russell, S. J., and Peng, K. W. (2007). Viruses as anticancer drugs. *Trends Pharmacol Sci* 28, 326-333.

Schlegel, R., Tralka, T. S., Willingham, M. C., and Pastan, I. (1983). Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* 32, 639-646.

Schnell, M. J., Buonocore, L., Boritz, E., Ghosh, H. P., Chernish, R., and Rose, J. K. (1998). Requirement for a non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to drive efficient budding of vesicular stomatitis virus. *The EMBO journal* 17, 1289-1296.

Schulz-Ertner, D., Jakel, O., and Schlegel, W. (2006). Radiation therapy with charged particles. *Semin Radiat Oncol* 16, 249-259.

Scofield, R. H., and Harley, J. B. (1991). Autoantigenicity of Ro/SSA antigen is related to a nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3343-3347.

Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R., and Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300, 1148-1151.

Shin, E. J., Wanna, G. B., Choi, B., Aguila, D., 3rd, Ebert, O., Genden, E. M., and Woo, S. L. (2007). Interleukin-12 expression enhances vesicular stomatitis virus oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope* 117, 210-214.

Schlegel, W. and Mahr, A. (2002). 3D-Conformal Radiation Therapy: A Multimedia Introduction to Methods and Techniques. Springer-Verlag, Heidelberg. Springer Verlag, Berlin.

Smythe, W. R., Hwang, H. C., Amin, K. M., Eck, S. L., Davidson, B. L., Wilson, J. M., Kaiser, L. R., and Albelda, S. M. (1994). Use of recombinant adenovirus to transfer the herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) gene to thoracic neoplasms: an effective in vitro drug sensitization system. *Cancer Res* 54, 2055-2059.

Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada : *Statistiques canadiennes sur le cancer 2006*, Toronto, Canada, 2006

Song, C., Micoli, K., and Hunter, E. (2005). Activity of the Mason-Pfizer monkey virus fusion protein is modulated by single amino acids in the cytoplasmic tail. *Journal of virology* 79, 11569-11579.

Springfeld, C., von Messling, V., Frenzke, M., Ungerechts, G., Buchholz, C. J., and Cattaneo, R. (2006). Oncolytic efficacy and enhanced safety of measles virus activated by tumor-secreted matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 66, 7694-7700.

- Stanners, C. P., Francoeur, A. M., and Lam, T. (1977). Analysis of VSV mutant with attenuated cytopathogenicity: mutation in viral function, P, for inhibition of protein synthesis. *Cell* 11, 273-281.
- Stanners, C. P., and Goldberg, V. J. (1975). On the mechanism of neurotropism of vesicular stomatitis virus in newborn hamsters. Studies with temperature-sensitive mutants. *The Journal of general virology* 29, 281-296.
- Stojdl, D. F., Lichty, B. D., tenOever, B. R., Paterson, J. M., Power, A. T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., *et al.* (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4, 263-275.
- Sun, X., Yau, V. K., Briggs, B. J., and Whittaker, G. R. (2005). Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 338, 53-60.
- Swintek, B. D., and Lyles, D. S. (2008). Plasma membrane microdomains containing vesicular stomatitis virus M protein are separate from microdomains containing G protein and nucleocapsids. *Journal of virology* 82, 5536-5547.
- Takaoka, A., and Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 8, 907-922.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews* 3, 133-146.
- Trosko, J. E. (1996). Role of low-level ionizing radiation in multi-step carcinogenic process. *Health Phys* 70, 812-822.
- Trosko, J. E. (2003). The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 36, 43-48.
- Trosko, J. E., Chang, C. C., Upham, B. L., and Tai, M. H. (2004). Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication. *Ann N Y Acad Sci* 1028, 192-201.
- Vandepol, S. B., Lefrancois, L., and Holland, J. J. (1986). Sequences of the major antibody binding epitopes of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus. *Virology* 148, 312-325.
- Villarreal, L. P., and Holland, J. J. (1976). RNA synthesis in BHK 21 cells persistently infected with vesicular stomatitis virus and rabies virus. *The Journal of general virology* 33, 213-224.

von Kobbe, C., van Deursen, J. M., Rodrigues, J. P., Sitterlin, D., Bachi, A., Wu, X., Wilm, M., Carmo-Fonseca, M., and Izaurralde, E. (2000). Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin Nup98. *Molecular cell* 6, 1243-1252.

Weissenhorn, W., Hinz, A., and Gaudin, Y. (2007). Virus membrane fusion. *FEBS letters* 581, 2150-2155.

Whelan, S. P., Ball, L. A., Barr, J. N., and Wertz, G. T. (1995). Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8388-8392.

Whitlow, Z. W., Connor, J. H., and Lyles, D. S. (2006). Preferential translation of vesicular stomatitis virus mRNAs is conferred by transcription from the viral genome. *Journal of virology* 80, 11733-11742.

Whitlow, Z. W., Connor, J. H., and Lyles, D. S. (2008). New mRNAs are preferentially translated during vesicular stomatitis virus infection. *Journal of virology* 82, 2286-2294.

Wollmann, G., Tattersall, P., and van den Pol, A. N. (2005). Targeting human glioblastoma cells: comparison of nine viruses with oncolytic potential. *Journal of virology* 79, 6005-6022.

Wu, H., Seki, T., Dmitriev, I., Uil, T., Kashentseva, E., Han, T., and Curiel, D. T. (2002). Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum Gene Ther* 13, 1647-1653.

Ye, Z., Sun, W., Suryanarayana, K., Justice, P., Robinson, D., and Wagner, R. R. (1994). Membrane-binding domains and cytopathogenesis of the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Journal of virology* 68, 7386-7396.

Yotti, L. P., Chang, C. C., and Trosko, J. E. (1979). Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by a tumor promoter. *Science* 206, 1089-1091.

Yu, W., and Fang, H. (2007). Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets* 7, 141-148.

Yuan, H., Yoza, B. K., and Lyles, D. S. (1998). Inhibition of host RNA polymerase II-dependent transcription by vesicular stomatitis virus results from inactivation of TFIID. *Virology* 251, 383-392.

Zhang, X., Green, T. J., Tsao, J., Qiu, S., and Luo, M. (2008). Role of intermolecular interactions of vesicular stomatitis virus nucleoprotein in RNA encapsidation. *Journal of virology* 82, 674-682.

Zhao, Y., Zheng, Z., Khong, H. T., Rosenberg, S. A., and Morgan, R. A. (2006). Transduction of an HLA-DP4-restricted NY-ESO-1-specific TCR into primary human CD4⁺ lymphocytes. *J Immunother* 29, 398-406.